

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 132

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE L'ACTION DE QUELQUES MEDICAMENTS
SUR LA MIGRATION
DES POLYNUCLEAIRES HUMAINS IN VITRO**

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 22 Mars 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Zam Zam HAMADI
née le 15 Septembre 1947
à BEYROUTH (Liban)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1971 - II - 102

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 132

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE L'ACTION DE QUELQUES MEDICAMENTS
SUR LA MIGRATION
DES POLYNUCLEAIRES HUMAINS IN VITRO**



THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et sou'enue publiquement le 22 Mars 1977

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Zam Zam HAMADI

née le 15 Septembre 1947

à BEYROUTH (Liban)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACÉUTIQUES

Année 1977 - 1978

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE L'ACTION DE QUELQUES MEDICAMENTS
SUR LA MIGRATION
DES POLYNUCLEAIRES HUMAINS IN VITRO



THÈSE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soumise publiquement le 22 Mars 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Zam Zam HAMAOI
née le 18 Septembre 1947
à BEYROUTH (Liban)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD LYON I

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD,
Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

U.E.R. de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Monsieur le Pr
Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de MATHEMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr
Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de PHYSIQUE NUCLEAIRE : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. N° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. N° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT

T R A V A I L

du Département d'Immunologie

de l'INSTITUT PASTEUR DE LYON

(Professeur M. CARRAZ et Madame C. VEYSSEYRE)

A MES PARENTS

A MES SOEURS ET FRERES

A ZEINAB

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma
reconnaissance et de ma profonde affection.*

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CARRAZ

Il a bien voulu nous accepter à l'Institut Pasteur de Lyon. Son accueil chaleureux nous a séduits.

Nous avons admiré l'ampleur de son expérience et bénéficié de son remarquable enseignement. Il a inspiré le sujet de ce travail et nous a guidés au cours de sa réalisation.

Son humanité et sa compréhension de nos problèmes nous ont été d'un grand secours durant notre séjour à Lyon.

Nous lui exprimons notre gratitude et l'assurance de notre respectueux dévouement.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR B. DREVON

Nous le remercions pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé. Il nous a fait bénéficier de l'étendue de ses connaissances et de son esprit érudit.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CHAMBON

Nous sommes très sensible à l'attention qu'il a bien voulu nous témoigner en siégeant dans ce Jury.

Nous avons vivement apprécié sa compréhension et ses grandes qualités humaines.

Nous l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

MADAME C. VEYSSEYRE

Malgré ses occupations considérables, elle nous a fait bénéficier de sa grande expérience et de l'étendue de ses connaissances.

Nous avons vivement apprécié sa compétence, son enthousiasme et ses grandes qualités humaines.

Nous la remercions de ses conseils judicieux, de son aide efficace et nous sommes heureuse qu'elle siége parmi nos Juges.

Nous la prions de bien croire à notre respectueux attachement.

A TOUS LES MEMBRES
DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON
en particulier :

LE PERSONNEL DU LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE

*Nous le remercions de son aide efficace
et l'assurons de notre amitié et de notre
sympathie.*

MONSIEUR LE DOCTEUR COURPRON

En remerciement de sa collaboration,

MONSIEUR FORGEMONT, Directeur Administratif

Pour son aide et sa bonne coopération.

MONSIEUR J.M. FAYARD

*Qui a bien voulu nous aider dans l'inter-
prétation statistique de nos résultats.*

MADemoiselle A.M. SCHWARTZ

*Qui a assuré avec efficacité tout le
travail de secrétariat.*

L'inflammation est un processus qui n'est ni simple, ni statique, et malgré l'étendue des connaissances que nous avons sur ce sujet, beaucoup de points restent obscurs. Le rôle des phagocytes dans l'inflammation apparaît indiscutable et l'établissement de la réaction inflammatoire est associé à des phénomènes de margination, de diapédèse et d'afflux cellulaire.

L'activité migratrice des polynucléaires s'exerce par la migration spontanée et par la migration dirigée liée à une reconnaissance de substances chimiotactiques, celles-ci déterminant une accumulation des cellules au niveau des foyers inflammatoires. Elles y exercent leur activité phagocytaire et libèrent ainsi leurs enzymes lysosomiales qui prolongent la réaction inflammatoire.

L'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens constitue actuellement un traitement symptomatologique, et la détermination de leur mécanisme d'action présente des difficultés particulières.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'action *in vitro* sur la migration des polynucléaires neutrophiles humains de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens. L'étude approfondie de leur mécanisme d'action ainsi qu'une meilleure compréhension de la physiologie du chimiotactisme permettraient d'élaborer de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Au cours de ce travail, nous avons étudié le ketoprofène et l'acide acétyl-salicylique et avons confronté leur action à celle de médicaments appartenant à d'autres classes - antalgiques - immunostimulants. Nous avons constaté la complexité des relations cellule-médicament.

P L A N

Première partie :

ETUDE DU POLYNUCLEAIRE ET DE SA PARTICIPATION
AUX MECANISMES DE L'INFLAMMATION.

1. LE POLYNUCLEAIRE.

1.1. Origine.

1.2. Morphologie.

1.3. Structure chimique -
Caractéristiques métaboliques.

1.4. Fonctions du polynucléaire neutrophile.

2. LES MECANISMES DE L'INFLAMMATION.

2.1. Généralités.

2.2. Mécanismes de l'inflammation.

2.3. Mode d'action des anti-inflammatoires.

Deuxième partie :

TRAVAUX PERSONNELS.

1. MATERIELS ET METHODES.

1.1. Matériels.

1.2. Méthodes.

2. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

3. ANALYSE DES RESULTATS ET ETUDE STATISTIQUE.

4. DISCUSSION.

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE DU POLYNUCLEAIRE ET DE SA PARTICIPATION
AUX MECANISMES DE L'INFLAMMATION

1. LE POLYNUCLÉAIRE

1.1. ORIGINE -

1.1.1. Généralités.

1.1.2. Maturation du polynucléaire.

1.1.3. Cinétique de la maturation.

1.1.4. Mécanisme de régulation de la granulopoïèse.

1.1.5. Méthodes d'étude de la granulopoïèse.

1.2. MORPHOLOGIE -

1.3. STRUCTURE CHIMIQUE - CARACTERISTIQUES METABOLIQUES -

1.4. FONCTIONS DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE -

1.4.1. Adhésivité.

1.4.2. Mobilité.

1.4.3. Phagocytose - Bactéricidie.

1. LE POLYNUCLÉAIRE

1.1... ORIGINE -

1.1.1. GENERALITES -

Les polynucléaires ou granulocytes sont les éléments blancs les plus importants du compartiment circulant chez l'adulte à l'état normal. Comme leur nom l'indique, ils renferment dans leur cytoplasme de nombreuses granulations. Leur nombre absolu s'élève à 4.000 ou 5.000/mm³. Ils représentent 70 à 72 % de la formule leucocytaire.

Depuis les travaux d'EHRlich, il est possible de classer ces cellules en trois catégories différentes suivant l'affinité tinctoriale de leurs granulations cytoplasmiques. C'est ainsi qu'on distingue :

- les granulocytes neutrophiles..... 65 à 70 %
- les granulocytes éosinophiles..... 2 à 3 %
- les granulocytes basophiles..... 0,5 %

Il faut souligner l'énorme prédominance des polynucléaires neutrophiles par rapport aux autres lignées.

1.1.2. MATURATION DES POLYNUCLEAIRES -

Toutes ces cellules se forment dans la moelle osseuse hématopoïétique, mêlées aux cellules de la série érythrocytaire. Elles se développent à partir de cellules souches qui, par un mécanisme encore inconnu, se différencient, puis subissent une maturation progressive.

L'existence de cellules souches médullaires est admise chez l'homme, elle n'a été bien étudiée que chez les animaux de laboratoire (218).

Les cellules souches médullaires comprennent deux populations : l'une en phase de repos (G.O.), l'autre composée de cellules engagées dans le cycle qui entrent en mitose et regagnent le pool G.O. La régulation de leur multiplication est encore inconnue.

La cellule souche (C.S.) totipotentielle donne naissance aux C.S. différenciées :

- C.S. donnant naissance à la lignée érythroblastique ou CFU-E (122) ;
- C.S. donnant naissance à la lignée mégacaryocytaire ou CFU-M (131) ;
- C.S. donnant naissance aux lignées granuleuse et monocyttaire ou CFC.

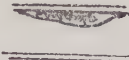
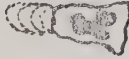
La CFC est une cellule de taille moyenne, sans caractéristique particulière (140).

La CFC donnant naissance à la lignée éosinophile semble différente de celle donnant naissance à la lignée neutrophile et monocyttaire (130).

Au cours de la période de maturation des cellules souches qui dure environ quatre jours, les cellules subissent quatre à cinq mitoses ; elles élaborent progressivement leurs granulations spécifiques tout en présentant des changements profonds dans leur taille, la forme de leur noyau et la basophilie de leur cytoplasme (20) et acquièrent leur activité fonctionnelle (figure 1).

1.1.3. CINETIQUE DE LA MATURATION -

L'ensemble des critères morphologiques et cinétiques permet de déterminer plusieurs stades caractéristiques : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte (appartenant au compartiment de multiplication), métamyélocyte et granulocyte mûr encore appelé polynucléaire, appartenant au compartiment de maturation sans multiplication.

	MYELOBLASTE—	POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE
charge négative de surface		
résistance à la déformabilité		
adhésivité		
étalement		
pseudopodes		
migration		
ingestion		

CORDON — MOELLE CIRCULATION TISSUS
HEMATOPOIETIQUE — MOELLE GENERALE

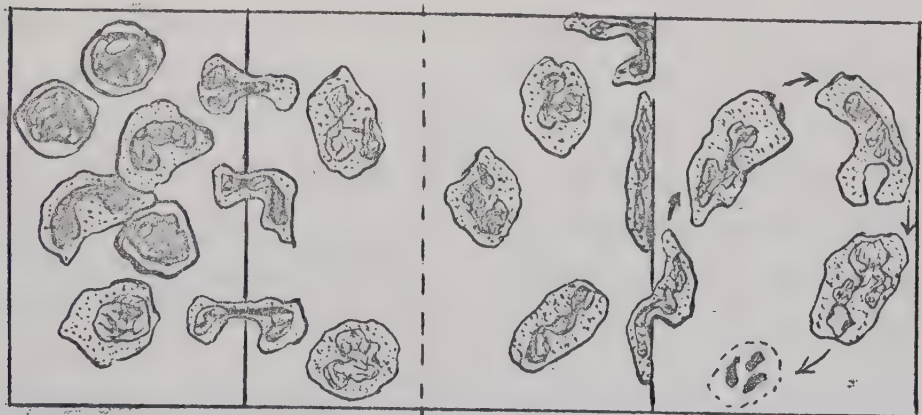


Figure 1 : MATURATION DU POLYNUCLEAIRE (116)

Au stade du myéloblaste et du promyélocyte, il y a une mitose ; par contre, il existe deux mitoses au stade du myélocyte. Donc un myéloblaste donne 16 métamyélocytes (44).

La durée de la mitose est identique pour les trois cellules : 0, 7 - 0, 8 heure . Il en est de même pour la durée de synthèse d'ADN qui est de 13 à 14 heures.

La durée d'un cycle cellulaire serait de 44 heures, et le temps de passage dans le compartiment prolifératif pour une cellule est de 176 heures.

- Cinétique au niveau du pool médullaire :

Les études in vivo avec la thymidine tritiée ont montré que la maturation du myélocyte dans la moelle dure environ 120 heures (22) : 30 heures pour le métamyélocyte, 42 heures pour les "band cells" et 48 heures pour le polynucléaire.

Douze jours sont nécessaires entre la différenciation de la cellule souche et la sortie du polynucléaire mûr de la moelle (198).

Les cellules mûres, capables de se déplacer, quittent la moelle osseuse, traversent la paroi d'un capillaire ; elles gagnent ainsi la circulation sanguine générale. Une fois parvenus dans les espaces extravasculaires, les polynucléaires survivent seulement quelques jours. Chez l'homme, 10 polynucléaires disparaissent chaque jour, principalement au niveau de l'intestin et des autres muqueuses (60).

- Cinétique au niveau du compartiment sanguin (pool circulant et pool marginal) :

Cette étude est faite à l'aide du développement des marqueurs, in vivo, des cellules (22, 34, 53, 55).

Les polynucléaires sont marqués au ^{51}Cr ou au DF ^{32}P (diisopropyl fluorophosphate), puis réinjectés dans la circulation.

La courbe de disparition est biexponentielle, et la première partie correspond à la répartition des polynucléaires marqués entre le pool marginal et le pool circulant (7). Cette disparition dure 2 heures.

On définit le taux de renouvellement des granulocytes (GTR) comme le nombre de polynucléaires passant dans le sang, par unité de temps et par kilogramme de poids. Ce taux est de 163.10^7 polynucléaires par kilogramme par jour avec le DF ^{32}P , et de 53.10^7 polynucléaires par kilo, par jour, avec le ^{51}Cr . Il reflète la libération des polynucléaires par la moelle.

- Cinétique au niveau du compartiment tissulaire :

Les polynucléaires neutrophiles pénètrent dans les tissus seulement au cours d'un processus inflammatoire, ils forment ainsi le pool tissulaire où ils vont exercer leurs fonctions de phagocytose et de bactéricidie.

La fenêtre cutanée représente le seul moyen d'exploration in vivo du pool tissulaire (22). La durée de vie des polynucléaires dans les tissus serait de 30 heures au maximum.

On admet en général que les polynucléaires ayant migré dans les tissus ne peuvent plus regagner le sang (21).

1.1.4. MECANISME DE REGULATION DE LA GRANULOPOIESE -

Ce mécanisme est très complexe et n'est pas encore bien élucidé :

- au niveau du sang périphérique, il existe de grandes variations du nombre de polynucléaires dans la journée par mobilisation du secteur marginal, sous l'influence de stimuli physiologiques, efforts musculaires, adrénaline, ACTH ;

- au niveau des cellules médullaires, la régulation est très importante, notamment au niveau du secteur de maturation

BROXMEYER (28) décrit le LIF "leucocytosis inducing factor" entraînant une libération des polynucléaires.

ROTHER (175) décrit un autre facteur LMF "leucocyte mobilizing factor".

Un troisième facteur LPF, le "leucocytosis promoting factor", ou facteur de MENKIN libéré par les zones inflammatoires, agirait sur la production médullaire et la mobilisation (22).

Certains auteurs ont montré que la sortie du polynucléaire du compartiment de réserve est sous la dépendance d'une maturation de la cellule (116).

L'acquisition par la cellule d'un certain nombre de propriétés (déformabilité, mobilité cellulaire, récepteur de surface) lui permet de passer à travers la membrane du capillaire sinusoiïde médullaire. On pense que les différents facteurs qui agissent sur le pool de réserve médullaire auraient pour rôle d'augmenter la mobilité des polynucléaires ainsi que le diamètre des pores de la membrane des sinusoiïdes (80).

La libération des polynucléaires par la moelle semble enfin être sous la dépendance du nombre de polynucléaires dans le sang périphérique (67).

Au niveau des cellules souches médullaires, la régulation est mal connue. La prolifération des cellules souches est sous la dépendance d'un "feed back" positif (172) représenté par un facteur de stimulation des colonies ou "colony stimulating factor" (CFS), n'agissant que sur les cellules souches déterminées granuleuses, et d'un "feed back" négatif, mis en jeu par le chalone granulocytaire de RYTOMAA et KIVINIEMI issue des cellules mûres et qui freine la multiplication des cellules jeunes.

1.1.5. METHODES D'ETUDE DE LA GRANULOPOIESE -

L'étude de la cellule souche totipotentielle n'est pas possible chez l'homme, tandis que l'étude de la cellule souche différenciée dans le sens granuleux est devenue une méthode d'exploration courante (204) :

- l'étude de la maturation granuleuse s'effectue à l'aide de marquage in vitro et in vivo par la thymidine 3H et le DF ^{32}P (22, 54) ;
- l'étude de la cinétique du polynucléaire se fait in vitro par marquage avec le DF ^{32}P ou le ^{51}Cr et réinjection des polynucléaires marqués (22, 53) ;

L'exploration du compartiment médullaire de réserve des polynucléaires se fait par des agents chimiques qui entraînent une libération des polynucléaires dans le sang circulant, par exemple l'étiocholanolone, les endotoxines et les corticoïdes.

Les endotoxines bactériennes déplacent d'abord le pool circulant vers le pool marginal, puis mobilisent le pool médullaire avec augmentation du pool vasculaire.

L'étiocholanolone diminue le temps de transit médullaire et augmente l'afflux des polynucléaires médullaires.

Mais l'inconvénient de ces substances, c'est qu'elles entraînent une poussée thermique avec des manifestations douloureuses.

Les corticoïdes augmentent la leucocytose sanguine par deux moyens : ils accroissent brutalement l'afflux médullaire et réduisent le flux vers les tissus (155).

L'étude du pool circulant des polynucléaires se fait par une simple numération des globules blancs et par l'établissement d'une formule sanguine sur lame.

L'étude du pool marginal se fait soit par l'étude du pourcentage de récupération des polynucléaires injectés

(22, 53), soit par le test à l'adrénaline (65). Le mécanisme d'action de l'adrénaline est mal connu, elle entraîne une désorganisation des polynucléaires (206) et une augmentation de 50 % des polynucléaires circulants.

L'exploration du pool tissulaire des polynucléaires se fait par la fenêtre cutanée (22).

1.2... MORPHOLOGIE -

1.2.1. ETUDE MORPHOLOGIQUE DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE NORMAL -

- Aspect sur frottis fixé et coloré par la coloration panoptique au May-Grunwald-Giemsa :

C'est une cellule de 12 à 14 microns. Le noyau est segmenté en plusieurs lobes (deux à cinq) réunis par un filament de chromatine.

La formule d'Arneth s'établit sur 100 granulocytes, en comptant pour chacun d'eux le nombre de lobes :

. 1 noyau non segmenté seulement incurvé.....	10 %
. 2 noyaux à deux lobes.....	25 %
. 3 noyaux à trois lobes.....	47 %
. 4 noyaux à quatre lobes.....	16 %
. 5 noyaux à cinq lobes et plus.....	2 %

Dans les cas pathologiques, on peut avoir des variations significatives (soit une augmentation du pourcentage de cellules à deux lobes, soit, au contraire, de cellules à 5 segments).

Le cytoplasme coloré en beige clair ou rosé est rempli de nombreuses granulations neutrophiles marron ou beige.

- Aspect au microscope électronique :

L'incidence de la coupe de cette cellule permet rarement d'observer tous les lobes nucléaires et leur réunion dans un seul plan ; aussi est-il parfois difficile, dans la

moelle osseuse, de distinguer les métamyélocytes des granulocytes mûrs, d'autant plus que leur cytoplasme présente un aspect très semblable.

Dans les granulocytes du sang, les granulations primaires, riches en peroxydase, subsistent en petit nombre (1, 11, 27).. Leur affinité pour les colorants ou la perméabilité de leur membrane ne se sont pas modifiées au cours de la maturation puisque sur ces frottis colorés il n'est pas possible de distinguer des granulations azurophiles dans un granulocyte mûr.

- Notion de lysosomes :

Les lysosomes sont des organelles cytoplasmiques limitées par des membranes lipoprotéiques et contenant des enzymes hydrolytiques (40).

Ils sont particulièrement nombreux dans les polynucléaires, de taille variable. Les techniques d'ultracentrifugation, et notamment les travaux de DEDUVE (47) ont montré que les granulations appartiennent à la fraction lysosomiale.

Les lysosomes jouent un rôle important dans la digestion intracellulaire et dans la lyse.

1.2.2. ETUDE MORPHOLOGIQUE DE LA LIGNEE GRANULEUSE
ET MATURATION DE SES GRANULATIONS -

- La cellule souche :

La cellule souche, médullaire, serait commune aux lignées granuleuses et monocytaires. Elle est de petite taille, de 8 à 10 microns, elle présente un ou plusieurs nucléoles. La chromatine est dispersée, les ribosomes libres dans le cytoplasme sont nombreux, ainsi que les mitochondries. Il existe quelques sacs ergastoplasmiques, la zone de Golgi est peu développée.

- Le myéloblaste neutrophile :

. Aspect sur frottis coloré :

C'est une cellule peu fréquente dans la moelle normale (0,5 à 2 %). Sa taille est d'environ 20 à 25 microns. Elle est le plus souvent ovale, parfois arrondie.

Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé. Le noyau possède une chromatine assez ouvragée. Les nucléoles, bleu clair, sont au nombre de deux à cinq. Le cytoplasme basophile est bleu clair, souvent plus foncé sur les bords ; il contient des granulations azurophiles petites et rares dans la cellule jeune et qui, peu à peu, deviennent de plus en plus nombreuses.

. Aspect au microscope électronique :

En coupe, cette cellule possède les caractères suivants : présence de plusieurs nucléoles dans le noyau dont la chromatine est dispersée, de nombreux ribosomes libres, de quelques sacs d'ergastoplasme et de nombreuses mitochondries.

Les granulations peroxydase positives sont de forme et de taille variables.

L'appareil sécrétoire du myéloblaste neutrophile (cisternes périnucléaires et golgiennes) est surtout actif au niveau de sa face concave.

Les corrélations entre l'ultrastructure (9), la cytochimie (10) et l'autoradiographie (61) ont permis de suivre la formation des premières granulations ; celles-ci ont été récemment nommées "primaires" par plusieurs auteurs (243) pour les distinguer des granulations azurophiles présentes dans d'autres catégories cellulaires (monocytes et lymphocytes).

- Le promyélocyte :

. Aspect sur frottis coloré :

C'est une cellule de 20 microns qui représente 2 à 8 % du myélogramme. Elle possède un noyau volumineux, souvent excentrique. La chromatine se condense, la teinte est plus violette. Les nucléoles sont en général invisibles. Le cytoplasme est moins basophile que dans le stade précédent. Une zone claire dépourvue de granulations déprime surtout le noyau : c'est l'emplacement de la zone de Golgi.

Les granulations, nombreuses, sont de deux sortes : les granulations azurophiles qui sont colorées en rouge vineux et rouge vif et les granulations neutrophiles souvent concentrées autour de la zone de Golgi sont de couleur marron clair.

. Aspect au microscope électronique :

Elles apparaissent de taille et de forme variable. La chromatine nucléaire est condensée en un fin liseré autour de la membrane. Le nucléole, petit, est toujours présent, entouré d'hétérochromatine. Dans le cytoplasme, l'ergastoplasme est très abondant. Au moins deux catégories de granulations azurophiles sont identifiées au microscope électronique : les unes sont denses, sphériques, les autres, allongées, contiennent une inclusion cristalline (1)

Les deux types sont riches en peroxydase et constituent les seuls éléments peroxydase positifs.

Durant la dernière phase du stade promyélocyte, la production des granulations primaires riches en peroxydase cesse et l'activité enzymatique disparaît de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi. Une nouvelle catégorie de granulations apparaît, correspondant aux granulations spécifiques : ce sont les granulations secondaires, dépourvues d'enzymes lysosomiales et de peroxydase (11).

- Le myélocyte :

. Aspect sur frottis coloré :

Sa taille est d'environ 15 microns. Il représente 13 à 20 % des éléments médullaires. Le noyau arrondi présente des masses chromatinienues. Le cytoplasme, acidophile, est parsemé de granulations neutrophiles de teinte marron ou beige.

. Aspect au microscope électronique :

Aucun nucléole n'est plus visible dans le noyau. Les granulations spécifiques dépourvues de peroxydase continuent à se former.

Les granulations azurophiles ne sont plus distinctes. La teinte rouge violet des granulations azurophiles au May-Grunwald-Giemsa paraît liée à la présence de muco-polysaccharides sulfate métachromatiques. La métachromasie disparaît au stade myélocyte du fait d'une répartition différente des mucopolysaccharides qui, de périphériques, deviendraient centraux.

Le nombre des granulations primaires diminue au cours de la maturation pour deux raisons : division cellulaire et arrêt de leur production, remplacée par celle d'une deuxième population granulaire.

- Le métamyélocyte :

. Aspect sur frottis coloré :

Ce stade est caractérisé par un allongement du noyau qui s'incurve, sans être encore comme dans la cellule mûre, séparé en plusieurs lobes réunis par un filament.

La chromatine est densifiée en masses foncées. Le cytoplasme est le même que celui du myélocyte.

. Aspect au microscope électronique :

Les petites granulations sont nombreuses et continuent à être produites. De nombreuses particules de glycogène sont disséminées dans tout le cytoplasme, alors que les ribosomes sont devenus rares. Les mitochondries, peu nombreuses, sont petites.

1.2.3. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES GRANULOCYTES EOSINOPHILES -

. Aspect sur frottis coloré :

La cellule est grande, 12 à 15 μ . Le cytoplasme rose possède des granulations orangées. Le noyau mûr est bilobé.

. Aspect au microscope électronique :

Les granulations sont uniformes, elliptiques, limitées par une membrane de 95 Angströms d'épaisseur.

Les granulations éosinophiles mûres sont riches en peroxydase et phosphatases acides. Les deux enzymes sont localisées à la périphérie dans la matrice homogène.

1.2.4. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES GRANULOCYTES BASOPHILES -

Ces granulocytes sont rares dans le sang (0 à 1 %).

. Aspect sur frottis coloré :

C'est une cellule plus petite, de 10 μ . Le noyau est assez volumineux et souvent masqué par la superposition des granulations très opaques noires violacées. Il présente fréquemment trois à quatre lobes disposés comme les folioles d'un trèfle.

. Aspect au microscope électronique :

Les granulations mûres des basophiles contiennent des particules denses de 200 Angströms environ.

Un seul type de granulations est produit au cours de la maturation

1.3... STRUCTURE CHIMIQUE ET CARACTERISTIQUES METABOLIQUES
DES POLYNUCLEAIRES -

La structure chimique et les systèmes enzymatiques des leucocytes peuvent être étudiés soit par des méthodes cytochimiques, soit par des méthodes biochimiques.

Le DNA siège essentiellement dans le noyau et le RNA dans le nucléole, dans le cytoplasme, ainsi que dans les granulations spécifiques (3).

La teneur en acide ribonucléique diminue progressivement au cours de la maturation.

Les neutrophiles et les éosinophiles sont riches en glycogène dont le métabolisme dépend de l'ACTH.

Les techniques cytochimiques et autoradiographiques ont démontré la présence de mucopolysaccharides, de tyrosine, de tryptophane et d'arginine.

L'équipement enzymatique des leucocytes est très complet, toutes les voies métaboliques principales sont présentes (44).

Les principales enzymes sont les hydrolases acides contenues dans les lysosomes, phospho-monoestérase acide et alcaline, désoxyribonucléase et ribonucléase, 5'-nucléotidase, lysozyme, cathepsine C et β -glucuronidase (40).

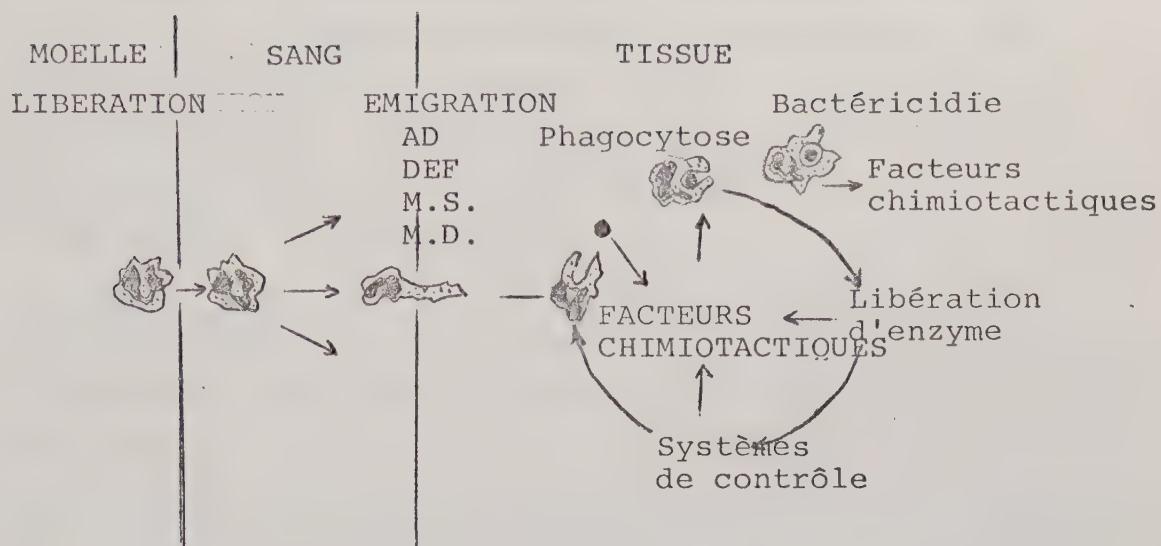
Le nombre des hydrolases leucocytaires a augmenté durant ces dernières années. Les lysosomes des neutrophiles contiennent des protéines basiques à action bactéricide (24).

1.4... FONCTIONS DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES -

Les polynucléaires neutrophiles constituent la première ligne de défense de l'organisme et leur migration représente une étape précoce et essentielle dans le mécanisme complexe de l'inflammation et du développement de la réponse immunitaire. L'absence d'une mobilisation des polynucléaires à partir de la micro-circulation jusqu'aux sites d'invasion s'accompagne d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité par infection bactérienne, virale ou fongique. Il paraît donc essentiel de pouvoir étudier et quantifier l'aptitude à la locomotion des polynucléaires neutrophiles, qui représente un des attributs caractéristiques des microphagocytes sanguins mûrs et fonctionnels.

La migration spontanée fait référence au mouvement non dirigé au hasard des cellules, tandis que le chimiotactisme fait référence à une migration orientée unidirectionnelle. Le chimiotactisme a été défini par Mac CUTCHEON (120) comme étant "la réaction par laquelle la direction de la locomotion des cellules est déterminée par des substances de leur environnement". Si la direction du mouvement se fait ni vers la substance, ni à l'opposé de celle-ci, le chimiotactisme est indifférent. Seule une migration orientée peut permettre la mesure du chimiotactisme car elle en est le fait spécifique.

Une investigation complète des mécanismes qui permettent aux polynucléaires de circuler comporte une observation de leur mobilisation in vivo, et également la mise en oeuvre de techniques in vitro qui permettent d'analyser les différentes fonctions cellulaires impliquées dans la migration - adhésivité, migration spontanée, chimiotaxie - et d'apprécier le rôle des différents facteurs qui les conditionnent.



AD = adhérence ; DEF = déformabilité ;

M.S. = migration spontanée ;

M.D. = migration dirigée.

Figure 2 : MECANISME ET ROLE DE L'ACCUMULATION CELLULAIRE
DANS LA REACTION INFLAMMATOIRE. (73)

1.4.1. L'ADHESIVITE -

L'adhésivité représente un caractère fonctionnel important du polynucléaire mature. L'adhérence des granulocytes à la paroi endothéliale après traumatisme tissulaire a été mise en évidence en microscopie électronique. Elle n'implique l'existence d'aucune substance liante et ne cause aucun dommage à la paroi. Elle est mise en jeu lors de la margination et de la migration dans les tissus, ainsi qu'au moment de la phagocytose.

- Méthodes d'étude :

L'adhésivité peut être étudiée in vitro selon deux méthodologies :

- . Les méthodes de GARVIN (75) ou celles qui en dérivent (30, 160) utilisent une colonne contenant des billes et de la laine de verre à travers lesquelles est passé l'échantillon qui peut être du sang total, ou mieux une suspension cellulaire. La numération des cellules avant et après élution permet d'établir le pourcentage de cellules ayant adhéré.
- . La méthode de LICHTMAN (116) utilise une cellule et mesure l'adhésivité des polynucléaires sur une lamelle de verre ou de plastique, selon une technique établie pour l'étude des globules rouges (77). Après incubation, une centrifugation permet de mesurer l'adhésivité qui est exprimée par le rapport : nombre de cellules adhérant encore sur le nombre total de cellules. Un examen microscopique après coloration permet l'identification des cellules.

- Mécanisme de l'adhésivité :

Une relation étroite unit l'adhésivité et la migration. La fixation des leucocytes sur le substrat constitue une condition préalable nécessaire à la migration (33). Ces deux phénomènes résultent de mécanismes intracellulaires similaires et sont soumis aux mêmes facteurs, et une mobilité diminuée est corrélée à une adhésivité augmentée (66).

Des drogues connues pour augmenter le taux d'AMPC comme la théophylline et la prostaglandine E_1 agissent simultanément sur les deux phénomènes. Leur action a été différemment interprétée selon les auteurs travaillant avec des techniques différentes. Elles inhibent la migration et stimulent l'adhésivité selon TSE (220) et BRYANT (31) ; pour LOMNITZER (118), elles diminuent l'adhésivité et augmentent la migration en tube capillaire.

Cela suggère néanmoins que adhésivité et migration en tube capillaire ne sont pas directement liées à la fonction tubulaire de la cellule, mais aux microfilaments (241), ce que confirme l'étude de l'action de la cytochalasine B qui interfère dans l'organisation des microfilaments, inhibe la migration et augmente l'adhésivité. La colchicine et la vinblastine, médicaments à action antitubulaire reconnue, par contre se révèlent sans effet sur les deux phénomènes (118), alors que la migration à travers filtre dépend de l'assemblage tubulaire (70) et est inhibée, comme l'ont montré TSE et BRYAND, par ces deux médicaments.

La dépendance vis-à-vis des cations bivalents est un caractère de l'adhésivité. L'EGTA, chélateur du Mg^{++} , empêche l'adhérence (30) qui semble par contre peu dépendante du Ca^{++} (29), ce qui confirmerait le rôle mineur des microtubules dont la formation exige la présence de Ca^{++} dans le phénomène de l'adhérence (79).

Cependant, selon RABINOWITZ (160), un facteur sérique thermolabile Ca^{++} et Mg^{++} dépendant serait indispensable à la fixation cellulaire (160) et il pourrait appartenir au système du complément.

Pour GARVIN, et cela a été confirmé par ZIGMOND (256), les inhibiteurs de l'oxydation resteraient sans effet, les seules cellules vivantes étant capables d'adhérer.

Mac GREGOR (121) a montré que l'adhésivité du polynucléaire était sensible à l'action de certaines substances, sans qu'il puisse déterminer leur mode d'action, mais a avancé

l'hypothèse que les substances anti-inflammatoires comme l'acide acétyl-salicylique, la prednisone, exercent leur activité en réduisant l'aptitude des polynucléaires à adhérer.

Des anomalies de l'adhésivité ont été retrouvées dans différentes situations cliniques seules ou associées à d'autres dysfonctionnements du polynucléaire (57, 199), mais les études systématiques et complètes restent rares.

1.4.2. LA MOBILITE -

- Migration in vivo :

. Méthodes d'étude :

De nombreuses méthodes ont été essayées pour étudier la migration des polynucléaires neutrophiles chez l'animal ou chez l'homme mais, pour la plupart, ces méthodes restent qualitatives ou semi-quantitatives.

Faisant suite à la technique de "l'empreinte" (touch print) sur sections de tissu fixées qui avait permis de mettre en évidence la séquence des événements de la réaction inflammatoire (247), la méthode dynamique que constitue la chambre auriculaire du lapin a permis d'observer la mobilisation leucocytaire périvasculaire déclanchée par divers stimuli (202).

Mais chez l'homme aussi bien que chez l'animal, c'est la fenêtre cutanée de REBUCK qui a apporté la possibilité d'études qualitatives approfondies des exsudats inflammatoires. Elle comporte l'abrasion d'une surface cutanée de 1 cm^2 atteignant la couche papillaire du chorion et le dépôt immédiat de lames stériles qui sont prélevées d'heure en heure pendant 24 heures. L'exsudat ainsi obtenu est coloré et la population cellulaire numérée est étudiée (164). Les polynucléaires constituent 95 % de l'exsudat cellulaire appru pendant les premières heures, ils sont progressivement remplacés par des monocytes à partir de la cinquième heure.

Technique simple et visualisant bien les évènements cellulaires, la fenêtre cutanée permet une connaissance fonctionnelle de l'inflammation expérimentale. Elle est un bon modèle de la réaction vis-à-vis d'une agression étrangère, bien qu'elle ne permette pas de comparaisons exactes ou une étude cinétique précise de la mobilisation.

Une des adaptations récentes de cette technique, comme la chambre cutanée plastique proposée par SENN et HOLLAND (188), permet actuellement l'étude extensive de la mobilisation leucocytaire localisée (186, 187), la quantification, chez l'homme, de la migration des polynucléaires neutrophiles à partir de la micro-circulation (185).

Un petit système stérile en polypropylène est fixé sur une zone d'abrasion standardisée ($1,2 \text{ cm}^2$) produite par une vrille à grande vitesse sur la peau de l'avant-bras interne. Chaque chambre présente deux ouvertures latérales qui permettent l'introduction de 2 ml de milieu. L'exsudat est prélevé périodiquement et remplacé par le même milieu : habituellement du sérum autologue. La mobilisation totale leucocytaire (TLM) et le taux de mobilisation leucocytaire (leucocytes $\times 10^6/\text{cm}^2/\text{h}$) sont l'expression de la mobilisation locale des polynucléaires neutrophiles puisque ces cellules représentent 95 % de la population présente, même 24 h et 48 h après l'abrasion.

La chambre cutanée plastique utilisée en présence de sérum autologue constitue une approche plus physiologique du polynucléaire chez l'homme que ne l'est la fenêtre de REBUCK, cependant elle ne mesure que la réponse globale des polynucléaires neutrophiles vis-à-vis d'un foyer traumatique ne distinguant pas l'attraction due aux facteurs sériques autologues du pouvoir chimiotactique des extraits tissulaires du sujet.

Très récemment, MASS (127) a proposé une nouvelle variante de la chambre cutanée n'impliquant aucun traumatisme cutané : l'épithélium stratifié est enlevé à l'aide d'un ruban

adhésif laissant intact les couches dermiques avec leurs capillaires, évitant ainsi la contamination du liquide de la chambre par des hématies et leucocytes des capillaires endommagés. Le nombre de cellules (polynucléaires neutrophiles) migrant dans la chambre est faible comparativement aux autres méthodes, mais n'est dû qu'aux seules substances chimiotactiques apportées dans la chambre, sans interférence possible avec des substances chimiotactiques provenant de tissu abrasé. La technique non abrasive de MASS explore exclusivement la capacité des polynucléaires neutrophiles de se déplacer à travers la barrière endothéliale et dermique vers une substance chimiotactique qui peut être standardisée. Il semble que, dans l'avenir, elle permette l'étude du mouvement des polynucléaires neutrophiles in vivo comparativement à l'étude du chimiotactisme in vitro, et de déceler ainsi des déficiences profondes de la migration neutrophile chez des sujets souffrant d'infections récurrentes (179).

. Physiologie et pathologie de la mobilisation des polynucléaires :

Des études de SENN, il ressort que les polynucléaires neutrophiles constituent la population leucocytaire prédominante dans la chambre de migration (95 %). Leur migration s'effectue chez l'homme normal selon différents types de cinétiques, cinétique rapide "en pic" ou "en plateau", cinétique plus lente "en pente ascendante", qui constituent un caractère représentatif du mécanisme de défense lié aux polynucléaires neutrophiles chez un individu, puisqu'il est retrouvé chez la plupart des individus testés plusieurs fois (figure 3), d'après SENN et JUNG (185). Bien que la signification particulière de chaque cinétique chez l'individu normal reste méconnue, il semble que l'étendue de l'invasion microbienne dépende de la vitesse de mobilisation des polynucléaires et que la susceptibilité aux infections microbiennes (mais non virales) soit liée à l'existence de polynucléaires lents (187).

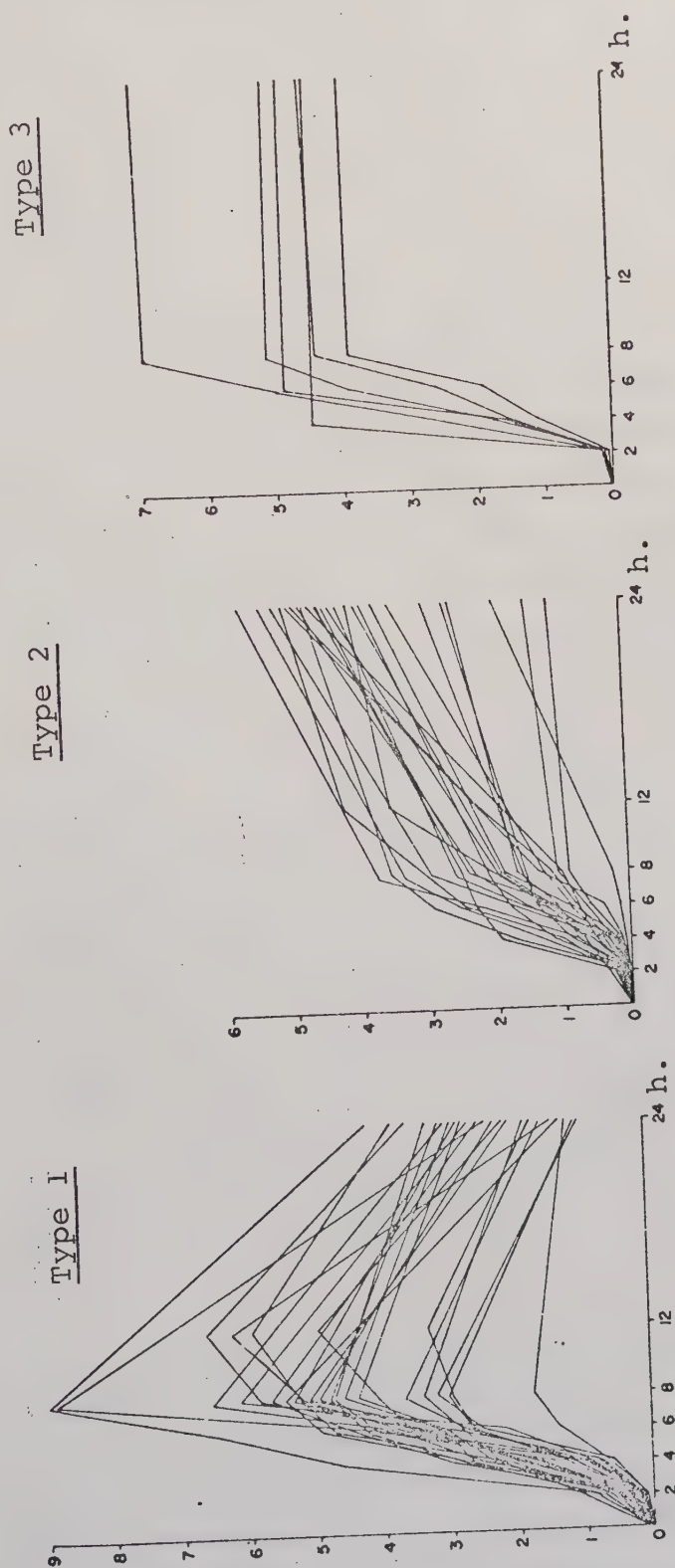


Figure 3 : LES DIFFERENTS TYPES DE CINETIQUE DE MIGRATION DU POLYNUCLEAIRE (185)

Il n'y a pas de corrélation entre la migration des polynucléaires neutrophiles et le sexe. Mais avec l'âge (au-delà de 40 ans), il semble qu'un nombre moins important de polynucléaires soit mobilisé. Il apparaît également que les sujets présentant une mobilisation "en pic" montrent un taux de polynucléaires circulant plus élevé que ceux présentant une mobilisation en "pente ascendante", sans que le nombre total de polynucléaires diffère. Cependant, on doit noter que la numération des polynucléaires circulant ne tient pas compte du pool marginal (soit 60 % de la population granulocytaire totale). Or il joue un rôle important dans la mobilisation rapide d'un grand nombre de polynucléaires dans l'espace périvasculaire et il peut subir d'importantes modifications d'origine pathologique ou médicamenteuse. Des facteurs endogènes, exogènes, modifient la migration des polynucléaires. L'addition de 5 à 50 % de sérum autologue à la solution tampon de la chambre augmente (x 20) la migration. Cela suggère la présence, dans le sérum, d'un facteur mobilisant les polynucléaires neutrophiles (83, 187). Le taux de migration, faible dans le tampon seul, est en quelque sorte l'image de la capacité de migration spontanée des polynucléaires neutrophiles au niveau des muqueuses et a été évalué par SENN à $2-3 \times 10^6/\text{cm}^2/\text{h}$ au niveau de la chambre cutanée. Mais la ou les substances présentes dans le sérum constituent des facteurs chimiotactiques qui, in vivo, favorisent puissamment la migration cellulaire et, parmi eux, le complément semble y avoir un rôle majeur (231).

Les surnageants acellulaires provenant d'expérimentations préalables conduites à différents stades, placés dans la chambre cutanée contenant du sérum autologue frais ou congelé, augmentent la migration des polynucléaires neutrophiles, montrant qu'il existe des facteurs stimulants d'origine tissulaire et leucocytaire qui proviennent de la surface abrasée ou de leucocytes libérés. Le facteur leucotactique sécrété par les lymphocytes sensibilisés en fait partie (231).

Récemment, YOSHINAGA (253) a décrit un facteur, la "leucoegressin" produite in vitro à partir d'IgG par action de la papaïne et retrouvée dans les extraits de tissus traumatisés. Médiateur naturel de la migration des polynucléaires neutrophiles, son étude chez l'animal, et en particulier chez l'animal complément-déplété, suggère que la "leucoegressin" est physiologiquement plus active que le complément (147) et que la plus grande partie de l'activité cytotoxique des lésions inflammatoires lui est due, alors que seulement 30 % dérivent de facteurs chimiotactiques associés au complément.

Elle interviendrait puissamment dans la migration mise en évidence dans les méthodes abrasives et serait responsable du nombre élevé de polynucléaires présents dans la chambre cutanée de SENN, mais ne serait pas impliquée dans la technique de MASS.

Parmi les substances vaso-actives, d'une manière inattendue l'histamine bloque la migration des polynucléaires, alors que la bradykinine, la sérotonine, ainsi que divers anti-histaminiques utilisés à différentes concentrations restent sans effet. Cela explicite que les différents médiateurs de la phase exsudative inflammatoire ne sont pas ceux qui déterminent la fuite cellulaire (84, 94).

L'influence de facteurs exogènes (comme les médicaments) sur la migration peut également être étudiée en chambre cutanée. Depuis PETERS (155), chez le sujet hématologiquement normal, les corticoïdes administrés per os montrent une activité différente qui reste discutée, et sans doute liée à la dose administrée. Par contre, un travail récent de SENN (185) fait chez l'homme et chez la souris révèle qu'une médication non stéroïdienne anti-inflammatoire, telle la phényl-butazone ou d'indométacine, déprime également la clearance granulocytaire et la migration locale, alors que l'acide acétyl-salicylique est sans effet.

Chez des sujets souffrant de diverses affections, on a recherché la corrélation qui pouvait exister entre le risque infectieux et l'aptitude à la mobilisation. Dans les leucémies aiguës myéloïdes, la diminution de la mobilité des polynucléaires s'accompagne d'une diminution de leur clearance, tandis que dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, seul existe un déficit de la mobilité. Dans les deux cas, la rémission s'accompagne d'une normalisation du taux des polynucléaires, de leur mobilisation locale et de leur clearance. Le fléchissement de leur aptitude à la migration constitue un élément pronostique important et l'effondrement de celle-ci indique un risque mortel d'infection.

D'après SENN également, dans les leucémies chroniques myéloïdes, il existe une corrélation entre l'état clinique et la migration des polynucléaires, alors que dans les leucémies chroniques lymphoblastiques, les complications infectieuses ne seraient que très partiellement liées à un dysfonctionnement neutrophile dépendant essentiellement d'une hypoproduction d'anticorps.

La haute morbidité infectieuse rencontrée dans le diabète sucré et dans la cirrhose alcoolique serait attribuable à un déficit de la migration des polynucléaires neutrophiles (98).

Il ressort de ces études de la mobilisation leucocytaire localisée que la migration des polynucléaires neutrophiles constitue une étape précoce mais importante de la défense de l'organisme contre l'infection, puisque l'inaptitude de ces cellules à migrer rapidement et en nombre hors de la micro-circulation pour participer activement à la réaction inflammatoire s'accompagne d'un important risque d'infection, même si toutes les autres fonctions cellulaires sont intactes.

- Migration in vitro :

Une connaissance approfondie de la mobilité in vitro du polynucléaire demande une étude simultanée de la migration spontanée en tube capillaire et à travers filtre, et celle de la migration unidirectionnelle liée au chimiotactisme.

. Migration spontanée :

a) Migration en tube capillaire :

Deux types de technique ont été proposés : une migration verticale et une migration horizontale.

- . La technique décrite initialement par KETCHEL (110) et modifiée par BRYANT (29) utilise des tubes à hémato-crite siliconés qui sont remplis à 70 % de leur capacité par du sang veineux hépariné, scellés à la chaleur et centrifugés 2 minutes. Ces tubes sont alors fixés côte à côte par de la paraffine verticalement sur une lame de verre après 1, 2 ou 4 h de séjour à 37°, la distance existant entre le point de départ et le front de migration est lue à l'aide d'un micromètre oculaire.

Dans une variante, MILLER (138) utilise une suspension de polynucléaires neutrophiles provenant de sang recueilli sur héparine, ajustée à 5×10^5 cellules dans 0,1 % d'albumine humaine et placée dans des tubes à micro-hématocrite siliconés de 32 mm. Ceux-ci sont alors placés verticalement, comme pour une vitesse de sédimentation, mais dans une chambre constituée de deux lames de microscope et remplie d'huile à immersion. La distance de migration après 3 heures à température ordinaire est mesurée avec une excellente précision.

- . La technique de migration horizontale en tube capillaire dérive de celle qui a été proposée par GEORGE et VAUGHAN (76) et adaptée par SOBORG et BENDIXEN (18) aux leucocytes humains pour l'étude in vitro de l'hypersensibilité retardée. Mac CALL (119) a utilisé le premier

cette technique dans une étude de la migration des polynucléaires "toxiques" provenant de sujets présentant des infections sévères.

Des tubes capillaires stériles sont remplis aseptiquement avec une suspension leucocytaire, scellés à la flamme et centrifugés. Les tubes, sectionnés au-dessus du culot, sont placés horizontalement dans une chambre de type Mac KANESS contenant un milieu de survie. Après incubation à 37°, les aires de migration sont planimétrées après projection. Quand la lecture est faite après 3 heures d'incubation, les polynucléaires représentent plus de 85 % des cellules ayant migré hors du tube.

Une modification de cette technique est utilisée par STEVENSON (201), qui comporte une séparation préalable des leucocytes dans le dextran et une élimination des globules rouges par lyse dans une solution de chlorure d'ammonium.

Cette technique de migration horizontale permet l'étude des différents facteurs qui peuvent intervenir sur le déplacement des polynucléaires.

On établit un pourcentage de modification de la migration qui est calculé sur le rapport :

$$\frac{\text{aires de migration en présence du facteur étudié}}{\text{aires de migration en l'absence du facteur étudié}}$$

La technique de migration en tube capillaire est utilisée, sous sa forme originelle ou avec des modifications, d'une manière extensive, pour étudier l'inhibition de migration des leucocytes sanguins humains sous l'action du facteur LIF sécrété par les lymphocytes sensibilisés en présence de l'antigène. Ce test représente un modèle in vitro de l'hypersensibilité à médiation cellulaire (173).

Une étude de LOMNITZER (118) a montré récemment que la migration en tube capillaire est un phénomène qui dépend

étroitement de l'adhésivité et qu'il doit être interprété à travers elle. C'est ainsi que, dans cette étude, l'analyse de l'inhibition de migration des leucocytes par le LIF a révélé qu'elle résultait d'une double activité, inhibante sur la migration et stimulante sur l'adhérence.

b) Migration à travers filtre :

La méthode de BOYDEN, classiquement utilisée pour l'étude du chimiotactisme, peut constituer une méthode d'étude de la migration spontanée in vitro (43, 102) puisqu'une migration spontanée, aussi bien que dirigée, peut prendre place dans ce système. La migration spontanée à travers filtre représente un paramètre du mouvement des polynucléaires neutrophiles différent de la migration en tube capillaire et peut, selon MILLER (133), donner une réponse différente de celle obtenue en tube capillaire. C'est ainsi que des sujets présentant un syndrome de Chediak-Higashi ont une migration spontanée anormale sur filtre, alors que la migration en tube capillaire reste non modifiée (35). Des situations inverses ont été notées (134, 135, 137).

. Migration dirigée : chimiotaxie :

Le chimiotactisme repose sur la notion de réponse dirigée. Cela implique dans les systèmes testés la mise en place de gradients de substance active et des conditions méthodologiques qui permettent aux cellules de migrer sur une distance suffisante pour exprimer leur réponse dirigée. La vitesse de migration qui a été évaluée à 9,4 $\mu\text{m}/\text{minute}$ in vivo peut atteindre, in vitro, 32 $\mu\text{m}/\text{minute}$ (98). Enfin, il est important que des conditions optimales de milieu de culture soient assurées de manière à permettre la meilleure expression de la mobilité cellulaire.

L'étude du chimiotactisme a pris son véritable essor à la suite des travaux de BOYDEN (26), et la plupart des techniques dérivent de la chambre de BOYDEN. Ces techniques mesurent la migration à travers un filtre.

a) Technique de BOYDEN :

La chambre de BOYDEN comporte deux compartiments séparés par une membrane perméable aux polynucléaires (millipore 3 μ). La suspension cellulaire est placée dans le compartiment supérieur, la solution à tester remplit le compartiment inférieur. Les cellules ayant traversé le filtre sont identifiées par examen microscopique du filtre après coloration. On peut utiliser une mesure sur une portion représentative de la population totale, puisqu'une grande majorité des cellules aptes au chimiotactisme répond à un stimulus approprié en migrant de l'autre côté du filtre où on peut les compter.

La chambre de BOYDEN donne la faculté de modifier les gradients de concentration des substances chimiotactiques. KELLER a prouvé l'existence d'un gradient entre les deux compartiments en démontrant la présence d'albumine radio-active dans le compartiment supérieur peu de temps après que celle-ci ait été introduite exclusivement dans le compartiment inférieur.

Quand le gradient de concentration est positif, les leucocytes se rendent en masse vers le compartiment inférieur, traversant entièrement le filtre. La technique originale de BOYDEN (à un seul filtre) est basée sur la supposition que les cellules restent attachées à la surface inférieure de celui-ci et y sont comptées. Or, on note qu'un pourcentage variable et imprévisible de cellules se détache et tombe au fond du compartiment inférieur, ce qui entache la reproductibilité et la fiabilité de la méthode.

Différentes modifications à la technique de BOYDEN ont donc été proposées, visant à améliorer le comptage des cellules.

KELLER (106) propose l'utilisation d'un second filtre imperméable aux leucocytes. Une double lecture effectuée sur la face inférieure du filtre supérieur (3μ) et sur la face supérieure du filtre inférieur ($0,45 \mu$) permet de numérer l'ensemble des polynucléaires ayant migré.

FREI (63), utilisant une chambre de migration spécialement conçue, compte les cellules présentes sur la face inférieure du filtre et leur ajoute les cellules numérées au fond de la chambre après centrifugation.

Certains auteurs préfèrent, à la suite de ZIGMOND (2, 257), estimer la profondeur de pénétration dans le filtre du front cellulaire en migration, ou utiliser le marquage au chrome 51 (69).

b) Méthode de migration sous gel d'agarose :

Une méthode d'étude du chimiotactisme (et de la migration spontanée), basée sur le phénomène de migration des leucocytes sous agarose, vient d'être proposée et paraît apte à une large utilisation clinique. Elle a l'avantage de permettre l'observation précise des cellules migrantes.

CUTLER (46), en 1974, en a proposé la première version adaptée à une étude de la migration des polynucléaires de cobayes. En 1975, NELSON (146) a décrit les modalités d'une technique sous agarose applicable à l'étude du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et monocytes humains.

Un gel de gélose est coulé dans des boîtes de culture cellulaire. Après refroidissement, des séries de trois puits sont découpées dans la gélose. La suspension cellulaire est répartie dans chacun des puits centraux. Les puits extérieurs sont remplis de la solution chimiotactique et les puits intérieurs reçoivent un milieu contrôle non chimiotactique (figure 4).



Figure 4 : MIGRATION SOUS AGAROSE
 A = migration spontanée.
 B = migration dirigée.

Après 2 heures d'incubation à 37°, les cellules sont fixées sur place et colorées. Les schémas de migration sont projetés et étudiés après agrandissement. La quantification du chimiotactisme se fait par mesure en centimètres, de la distance linéaire des cellules ayant migré depuis le bord du puits central vers le facteur chimiotactique (substance A) et de la distance linéaire des cellules ayant migré spontanément vers le milieu de contrôle (distance B). On établit un index chimiotactique A/B et $A - B$.

L'étude de la morphologie des cellules peut être faite après fixation et coloration en microscopie optique ou en microscopie électronique (145).

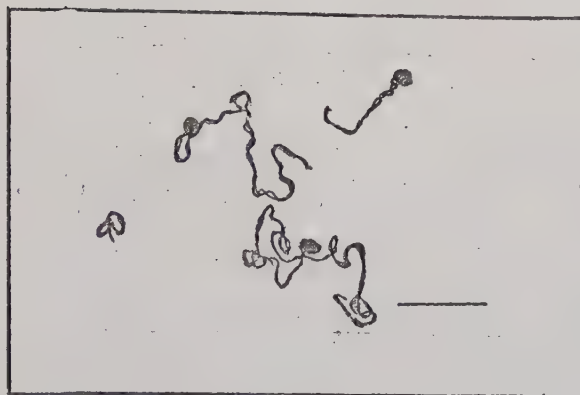
Les différentes méthodes d'étude du chimiotactisme figurent dans le tableau I.

METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DU CHIMIOTACTISME ET LEURS MODES DE LECTURE

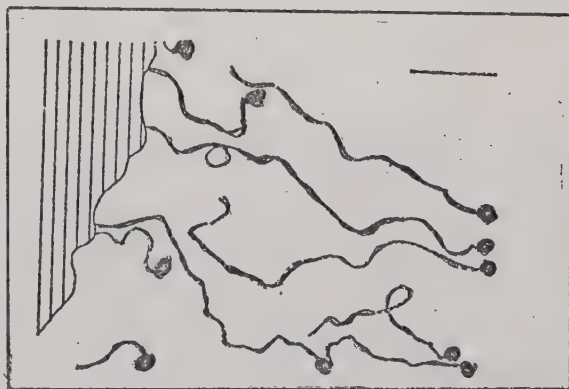
METHODES	AUTEURS	CARACTERES PARTICULIERS	LECTURE
CHAMBRE DE BOYDEN A 2 COMPARTIMENTS 1 SEUL FILTRE 3 μ	BOYDEN, 1962 (26) KELLER, 1966 (101) CORNELLY, 1966 (43) YAMAMOTO, 1971 (253) REGAMEY, 1973 (165) FREI, 1974 (63) NAIDU, 1974 (143) ZIGMOND, 1973 (257) MARCHAL, 1975 (125) ADDISON et BABBAGE, 1976 (2) BAUM, 1971 (12) HILL, 1975 (90)	cuve fond plat. microméthode papier filtre + solu- tion chimiotactique cytocytrifugeuse " " 3-5	Face inférieure du filtre $\bar{x}$ = nombre de cellules par champ $\Sigma \phi$ (filtre + fond de cuve) Index chimiotactique = $\frac{\Sigma \phi (F = c) \times 100}{\text{total PN déposés}}$ Distance du front cellulaire en micromètres Distance du front cellulaire en micromètres Distance du front cellulaire en micromètres Index chimiotactique = $\frac{\text{Nbre } \phi \text{ face inférieure}}{\text{Nbre } \phi \text{ face supérieure}} \times 100$
DOUBLE FILTRE	KELLER, 1972 (106) GALLIN, 1973 (69)	filtre 3 μ et 0,45 2 filtres 5 μ - Cr ⁵¹	$\Sigma \phi$ filtre perméable + filtre imperméable Activité chimiotactique = $\frac{\text{cpmF/mn} \times 1000}{\text{cpm } 10^6 \phi/\text{mn}}$
METHODE SOUS AGAROSE	CUTLER, 1974 (46) NELSON, 1975 (146)		Index chimiotactique = $\frac{A}{B}$ ou A - B

- Mécanisme de la migration :

RAMSEY, en cinémicrographie (161), n'a pu montré une différence fondamentale dans la manière dont les polynucléaires se déplacent au hasard ou sur une action chimiotactique. Chaque cellule se déplace à sa vitesse propre et d'une manière spasmodique. Le chimiotactisme détermine la direction du mouvement sans en modifier la vitesse (10 à 34 micromètres par minute selon les auteurs), le voile cytoplasmique frontal ou l'appendice caudal arrière restant l'expression morphologique du mouvement. Une étude récente en microscopie électronique conduite par NELSON (146) fait état de vésicules ou de fines structures rappelant des pseudopodes qui apparaissent en scanning à la périphérie de la cellule chimiotactée.



Polynucléaire
en migration spontanée



Polynucléaire
en migration dirigée

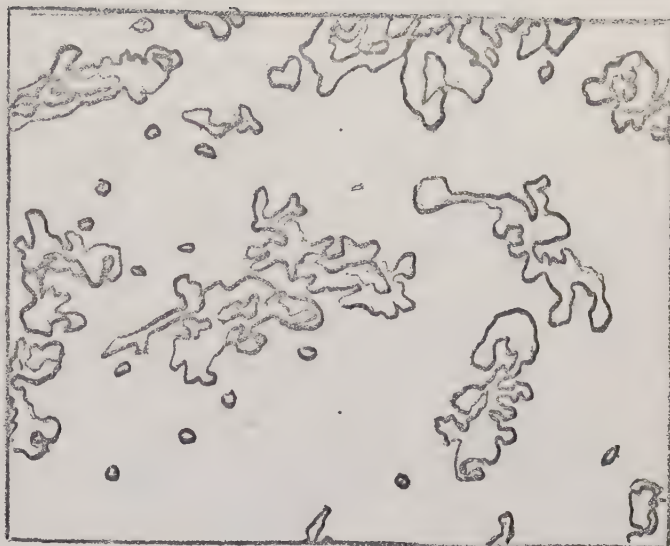
- Figure 5 (161) -

En réalisant des migrations de polynucléaires humains en présence de différentes concentrations absolues et en présence de gradients de facteurs chimiotactiques d'origines diverses, WILKINSON et KAY (248) sont arrivés à la conclusion que la chimiotaxie constitue une réponse mixte dans laquelle le facteur stimulant augmente simultanément la migration au hasard indépendante du gradient de concentration et la migration unidirectionnelle consécutive à un gradient positif. Ces cellules répondent à une concentration absolue de facteur chimiotactique en augmentant leur migration au hasard, et à un gradient de concentration en se déplaçant d'une manière unidirectionnelle (fig.5). Ces 2 composants de la réponse participent au mécanisme de la chimiotaxie. Le mécanisme par lequel un stimulant chimiotactique initie au niveau de la cellule la migration reste mal connu, même dans le cas de l'expérimentation in vitro. Mais il apparaît que la mobilité du polynucléaire dépend des qualités de sa membrane. Son élasticité et sa déformabilité, caractères de maturité, commandent sa sortie de la moelle vers le sang périphérique (116) et le rendent fonctionnel.

La contraction et l'expansion cytoplasmiques s'accompagnent d'une modification des charges de surface de la membrane et GALLIN a montré que la réaction polynucléaire - cytotaxine détermine une diminution de celles-ci et que l'hydrocortisone, en inhibant l'action de C_5 sur les charges superficielles du polynucléaire, inhibe le chimiotactisme (71). L'intégrité des charges de surface membranaire est le garant de la mobilité du polynucléaire neutrophile (fig. 6).



POLYNUCLEAIRES
EN MIGRATION SPONTANEE



POLYNUCLEAIRES
EN MIGRATION DIRIGEE

- Figure 6 -

. Facteurs du chimiotactisme :

Les agents qui induisent le chimiotactisme sont essentiellement des protéines et des polypeptides ; ils sont classés selon leur mode d'action : les cytotoxines stimulent directement les cellules - les cytotoxigènes induisent la formation de cytotoxines. Ces substances sont d'origines diverses, endogènes ou exogènes.

Parmi les cytotoxines exogènes, on peut citer la caséine, les protéines dénaturées, les peptones, certains facteurs bactériens et viraux, des produits libérés par les leucocytes ou les lymphocytes stimulés. Les gamma-globulines agrégées, les complexes immuns, le venin de cobra, le glycogène, sont des cytotoxigènes exogènes qui agissent sur le système du complément.

Le système du complément représente le système chimiotactique endogène le plus important. Les trois fragments chimiotactiques C_3a - C_5a - complexe C_{567} , résultent de l'activation du complément par les enzymes de la voie classique ou de la voie alterne, mais aussi d'origines diverses, tissulaires, cellulaires, sériques, bactériennes ou virales (235, 236). Interviennent également le système de la kallikréine et celui de la plasmine (100, 215, 221).

Avec GALLIN, on admet actuellement que plusieurs cytotoxines différentes peuvent être présentes dans le sérum humain activé et que leur nature dépend du cytotoxigène utilisé, qui active préférentiellement le système du complément, de la plasmine ou de la kallikréine.

Des inactivateurs interfèrent également dans la réponse chimiotactique (19, 23), mais les données les concernant sont encore peu nombreuses. Certains inactivent les cytotoxines, mais des inhibiteurs interviennent sur la cellule elle-même (Neutrophil Immobilizing Factor : NIF - Leukocyte Immobilizing Factor : LIF) et sont responsables de l'accumulation des neutrophiles sur les sites inflammatoires (71, 173). L'activité serait dirigée contre la seule mobilité pour le MIF, mais serait plus complexe pour le LIF qui interviendrait également sur l'adhérence (118). TILL et WARD ont confirmé l'existence, dans le sérum humain normal, de deux inactivateurs du chimiotactisme (CFI) différents de l'inactivateur de l'anaphylatoxine qui diminue la migration spontanée et le chimiotactisme sans toucher aux autres fonctions du polynucléaire (219).

Ces inhibiteurs et inactivateurs constituent un système "antichimiotactique" complexe qui bloque les médiateurs chimiotactiques contre la réaction inflammatoire, prévient son emballement et la limite à un évènement physio-pathologique spécifique.

Ce système "antichimiotactique" se présente selon GALLIN et WOLFF (73) de la manière suivante :

<u>Inactivateurs</u>	<u>Facteurs chimiotactiques inactivés</u>
Plasma.....	C3a C5a C567 Kallikréine Sérum normal SN SN activé par endotoxine Kallikréine
Alpha2-macroglobuline.....	Kallikréine
CI inhibiteur.....	Plasminogène activateur
Produits de la phagocytose des polynucléaires.....	C5a Sérum activé par endotoxine

<u>Source de l'inhibiteur</u>	<u>Cellules inhibées</u>
Facteur immobilisant les neutrophiles.....	Neutrophiles Eosinophiles
Facteur inhibant la migra- tion (à partir de lymphocytes activés).....	Macrophages
Streptolysine O.....	Neutrophiles
Facteur sérique présent dans des cas pathologiques.....	Neutrophiles

. Reconnaissance des facteurs chimiotactiques :

Les protéines natives ne sont pas chimiotactiques. La dénaturation leur confère une activité chimiotactique et la reconnaissance de la protéine dénaturée par les cellules est liée au changement tridimensionnel de la molécule. Des modifications secondaires comme la polymérisation n'interviennent pas, mais la conjugaison de groupements non polaires augmente l'activité chimiotactique de la protéine. La reconnaissance de la protéine chimiotactique ne semble pas le fait d'une liaison stéréospécifique étroite entre un récepteur cellulaire de surface et des groupements latéraux (248). On a pu invoquer une "spécificité" des agents chimiotactiques vis-à-vis d'un type cellulaire (polynucléaire neutrophile, éosinophile ou macrophage), mais on s'accorde à reconnaître qu'elle serait due à la nature des groupements non polaires portés par les cytotoxines (103, 104, 246, 247).

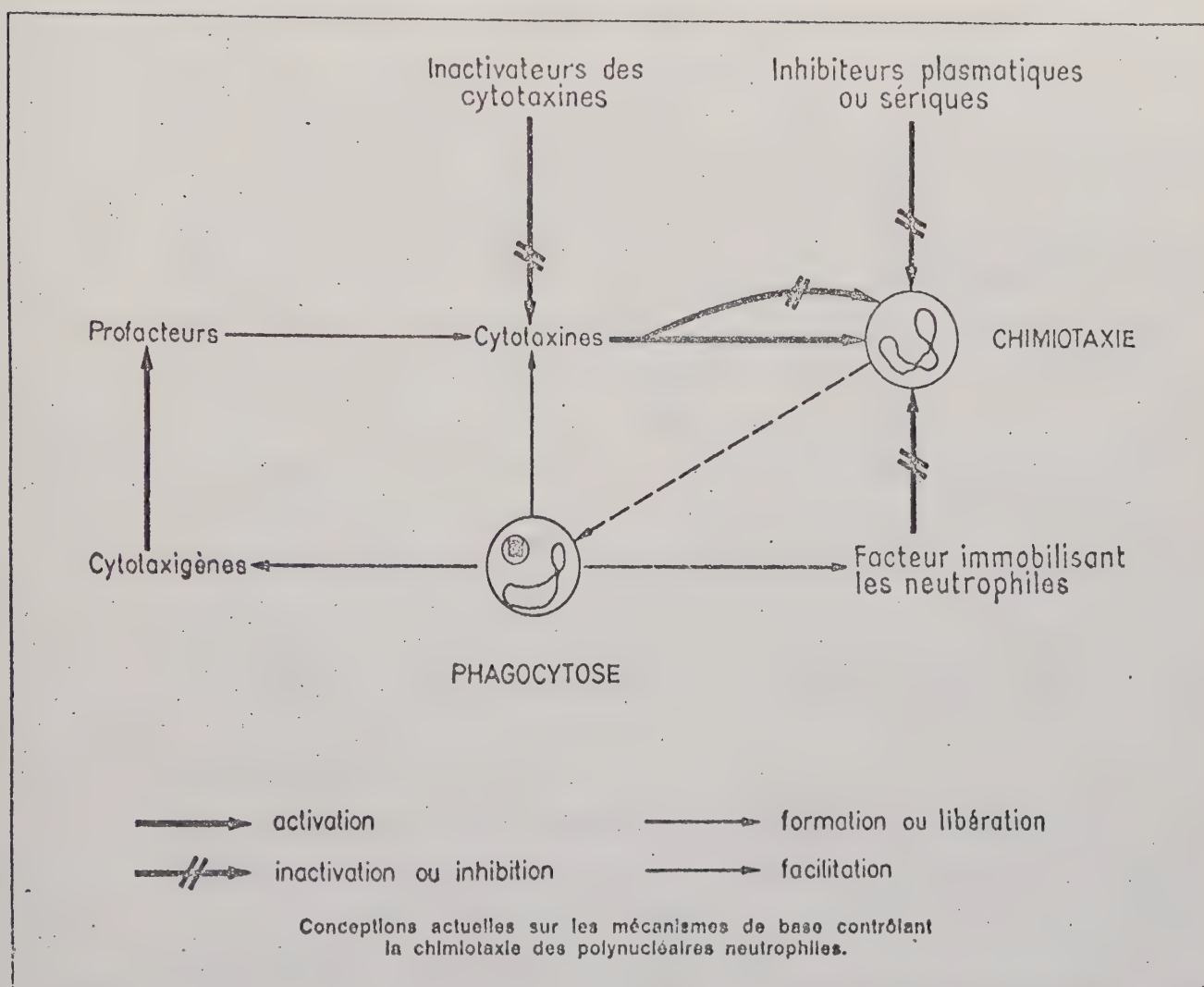


Figure 7 : LA CHIMIOTAXIE ET LA MIGRATION LEUCOCYTAIRE "IN VIVO"

WILKINSON (249) a montré que des interactions hydrophobes à la surface de la cellule peuvent jouer un rôle majeur dans la reconnaissance des facteurs chimiotactiques et l'orientation de la locomotion. La dénaturation induit une activité attractrice en augmentant l'hydrophobicité de la molécule en milieu aqueux : l'ouverture de la molécule extériorise les groupements hydrophobes enchâssés dans la molécule. La molécule, devenue instable, montre une affinité pour les surfaces où elle peut stabiliser ses groupements hydrophobes. La membrane cellulaire, avec sa double couche phospholipidique, permet à ces groupements de se lier aux chaînes lipidiques hydrocarbonées ou avec des régions hydrophobes des protéines membranaires. Cette liaison, consommatrice d'énergie, n'est pas spatialement dirigée, c'est-à-dire ne nécessite pas l'existence de récepteurs spécifiques. L'action d'agents toxiques comme la streptolysine O ou la toxine de *Clostridium perfringens*, qui modifient la membrane cellulaire et diminuent le pouvoir chimiotactique, confirme que la réponse chimiotactique est incluse au niveau de la couche lipidique de la membrane du polynucléaire neutrophile (224, 250).

. La locomotion :

Des études récentes permettent de mieux comprendre le phénomène de la locomotion, et en particulier de la locomotion dirigée. Celle-ci paraît résulter de l'intervention simultanée de différents mécanismes : structures contractiles, systèmes enzymatiques ou cationiques, acides nucléiques.

a) Structures contractiles :

L'isolement dans les leucocytes de "protéines contractiles", voisines de l'actine et de la myosine musculaires (184,210), et la mise en évidence de micro-filaments et de micro-tubules dans les phagocytes ont confirmé l'hypothèse selon laquelle la locomotion cellulaire serait due à des structures contractiles (62).

Les polymères d'actine qui résultent d'un état d'équilibre entre la G-actine et la F-actine et constituent les micro-filaments réagissent avec la myosine cellulaire et l'A.T.P., selon un processus visible en microscopie électronique. Attachés à la membrane cellulaire, les micro-filaments, par une suite de contractions et de relaxations, peuvent déterminer de légers déplacements cytoplasmiques nécessaires à la locomotion (163). Bien que les substances anti-actines comme la cytochalasine B ne paraissent modifier systématiquement ni la locomotion, ni la chimiotaxie des polynucléaires neutrophiles (16, 256), il apparaît hautement probable que la locomotion (et la phagocytose) sont sous la dépendance des micro-filaments qui en constitueraient le mécanisme moteur (251).

Les micro-tubules sont constitués des sous-unités d'une protéine : la tubuline existant en équilibre entre une forme soluble et une forme micro-tubulaire. Ils accompagnent les micro-filaments et se fixent sur les mêmes zones de la membrane cellulaire (190). Leur rôle dans le déplacement du polynucléaire n'est pas parfaitement compris. Les polynucléaires traités par des substances anti-tubulaires comme la colchicine, la vinblastine ou l'acide podophylique-éthyl-hydrazide, qui empêchent la polymérisation de la tubuline et bloquent sa fonction, conservent une migration au hasard active, mais perdent leur capacité de se déplacer unidirectionnellement vers un gradient chimiotactique (13, 178).

L'assemblage et la polarisation des micro-tubules, selon les uns, détermineraient la direction de la migration, tandis que, selon les autres, ils ne constitueraient que le "châssis" de la cellule sans intervenir dans sa locomotion. MALAVISTA suggère qu'ils pourraient intervenir, mais seulement dans le mécanisme de la libération lysosomiale (124).

Cependant, on admet que c'est au niveau de micro-tubules et micro-filaments qu'est capté le signal reçu de la substance chimiotactique par la membrane cellulaire. Ce signal pourrait être un flux transmembranaire d'ions Na^+ et K^+ qui serait responsable secondairement d'une libération de calcium à partir du stock cellulaire (191, 214).

b) Les enzymes cellulaires :

BECKER et WARD (14,17,237) ont montré que la migration chimiotactique nécessitait l'intervention de systèmes enzymatiques. Selon eux, il y a deux estérases différentes dans le polynucléaire neutrophile qui conditionneraient la migration : une "activated esterase" toujours présente sous une forme active et une "activable esterase" ou pro-estérase 1 qui déterminerait la mobilisation des polynucléaires neutrophiles par l'intermédiaire du C_3a - C_5a et C_{567} (15). Les sites auxquels s'active la pro-estérase 1 détermineraient la direction de la migration. Cependant, l'inhibition de la migration par les phosphonates, d'abord attribuée à l'action anti-estérase, semble attribuée plus volontiers actuellement à une action détergente directe sur la double couche membranaire (252). L'énergie nécessaire serait fournie par la glycolyse anaérobie pour la plus grande part (82). Le rôle de ces mécanismes enzymatiques n'est connu ni dans la migration du polynucléaire, ni dans ses autres fonctions.

On admet également que les sérines estérases comme la kallikréine ou l'activateur du plasminogène, ainsi que l'A.T.Pase-ouabaïne sensible pourraient participer au même processus de stimulation du chimiotactisme, et même se substituer à la pro-estérase (108, 233).

c) Les nucléotides cycliques :

La participation des nucléotides cycliques au mécanisme inducteur de la locomotion cellulaire est couramment admise depuis que TSE (220) et RIVKIN (169) ont montré que l'AMPc inhibait la migration spontanée et la

chimiotaxie. Les substances qui augmentent le taux d'AMPc inhibent la mobilité du polynucléaire (91), tandis que celles qui augmentent le GMPc la favorisent (58, 74). Cependant, très récemment, LOMNITZER a montré que les polynucléaires neutrophiles humains traités par des substances réputées augmentant l'AMPc avaient une adhésivité diminuée et migraient plus loin en tube capillaire (117), prouvant ainsi que la migration en tube capillaire et la migration à travers filtre dépendent de mécanismes différents et difficilement interprétables.

Les prostaglandines E_1 , E_2 , F_1 alpha et F_2 alpha, se sont révélées chimiotactiques pour les polynucléaires humains, alors que la prostaglandine A_1 inhibe la migration spontanée et la chimiotaxie (171).

La relation pouvant exister entre le métabolisme du système AMPc - GMPc, les prostaglandines et la migration du polynucléaire dans la réponse inflammatoire, reste à préciser.

d) Les cations divalents :

La libération précoce du calcium cellulaire sous les différents stimuli chimiotactiques mise en évidence par GALLIN (70) laisse penser que le calcium participe activement au phénomène du chimiotactisme en corrélation avec les nucléotides. Différentes hypothèses peuvent être envisagées : fuite du calcium due à l'augmentation de l'AMPc concomitante, élévation du taux d'AMPc consécutive à la fuite du calcium ou modulation du taux de GMPc par le taux de calcium intracellulaire (5), qui demandent à être confirmées.

On admet que la redistribution du calcium intracellulaire détermine l'assemblage et/ou l'interaction des micro-filaments et des micro-tubules, et qu'il existe une relation étroite entre les nucléotides cycliques, le métabolisme du calcium, les structures contractiles et la mobilité cellulaire.

La migration du polynucléaire représente l'aboutissement d'une suite de réactions hétérogènes et simultanées, consommatrices d'énergie et cations dépendantes, aboutissant à l'activation des structures contractiles intracellulaires. Ces réactions ne sont pas systématiquement spécifiques de la migration et la chimiotaxie, et elles peuvent être rattachées à celles qui accompagnent la phagocytose et la sécrétion lysosomiale, autres manifestations du mouvement cellulaire (mais partiel et interne) qui participent au même mécanisme de défense de l'organisme.

- Résultats en pathologie :

Une altération de la chimiotaxie est généralement associée à une susceptibilité aux maladies infectieuses.

Les anomalies de la chimiotaxie sont rattachables à deux classes de phénomènes, déficit au niveau des facteurs chimiotactiques ou déficit au niveau cellulaire (73, 136).

Le déficit en facteurs chimiotactiques résulte d'un défaut de leur production ou de la présence d'inhibiteurs ou d'une inactivation parasite.

Les déficits concernent principalement les facteurs du complément C_3 - C_5 - C_2 et ont été décrits chez des sujets souffrant de processus infectieux à répétition (4, 72, 137), mais également le système des kinines (238).

Les inhibiteurs sériques du chimiotactisme, normalement présents, assurent la modulation de la réponse inflammatoire (57, 73, 138). Leur présence à un taux élevé a été retrouvée dans des affections s'accompagnant d'infections à récides, et leur action apparaît prépondérante. Leur action inhibitrice s'exerce directement sur le polynucléaire, ou indirectement par l'intermédiaire du système du complément (50, 228, 229).

La découverte par GOETZ et AUSTEN (81) d'un facteur immobilisant les neutrophiles (NIF) libéré au cours de la phagocytose et inhibant le C_5a met en évidence le rôle régulateur de la relation chimiotaxie-phagocytose.

D'après GALLIN et WOLFF (73), les anomalies des facteurs chimiotactiques ou humoraux sont les suivantes :

Production diminuée :

- Déficiences du substrat :
 - . facteurs du complément
 $C_{1r} - C_2 - C_{3a} - C_{5a}$
 - . facteurs du système des kinines,
 facteur Hageman - prékallikréine.
- Inhibiteurs de la formation des facteurs du complément :
 - . lupus érythémateux systémique.
- Diminution des produits dérivés de cellules :
 - . lymphokines chimiotactiques,
 facteur de transfert dialysable.

Fonction inhibée :

- Cirrhose - Urémie.

Inactivateurs de facteurs chimiotactiques :

- En excès :
 - . maladie de Hodgkins
 - . maladies allergiques aiguës.
- Déficience :
 - . déficience en α_1 -antitrypsine.

Les anomalies fonctionnelles du polynucléaire lui-même peuvent se situer au niveau de l'adhésivité et de la déformabilité, de la migration spontanée et de la migration dirigée (73). Elles ont été retrouvées, seules ou associées, dans un certain nombre d'affections.

Le mécanisme qui entraîne le défaut d'adhésivité est mal connu, mais la fixation des polynucléaires sur le substrat constitue une condition préalable nécessaire à la migration et, avec EDELSEN (57), on admet qu'une anomalie de l'adhésivité peut être associée à un déficit de la mobilité.

Un défaut de l'aptitude à la déformabilité noté dans la maladie de CHEDIAK-HIGASHI ou dans ses anomalies animales est rendu responsable du chimiotactisme diminué (35), bien qu'on ait également suggéré que le déficit de migration soit lié au système GMP-micro-tubules.

MILLER a noté qu'il pouvait exister une dissociation entre les anomalies de la migration spontanée et celles de la migration dirigée. Des déficits concernant la seule chimiotaxie ont été décrits et peuvent être congénitaux ou acquis (133, 138, 139).

Mais on a également pu constituer des groupes de patients présentant une anomalie de la migration spontanée accompagnée d'un déficit de la chimiotaxie, et MILLER a décrit pour eux le syndrome du leucocyte paresseux "lazy leukocyte syndrome" (135).

D'après GALLIN et WOLFF (73), les principales anomalies fonctionnelles du polynucléaire cliniquement reconnues sont les suivantes :

	<u>Paramètres étudiés :</u>			
	<u>Adhésivité</u>	<u>Déforma- bilité</u>	<u>Migration spontanée</u>	<u>Migration dirigée</u>
ADHESIVITE :				
Alcool				
Stéroïdes	AN	N ou NT	AN	AN
Cas isolés				
DEFORMABILITE :				
Chediak-Higashi	N	AN	AN	AN
Leucocytes néo-nataux				
MIGRATION SPONTANEE :				
Syndrome des leucocytes paresseux	N	N ou NT	AN	AN
Cas isolés				
Sujets avec actine anormale				
MIGRATION DIRIGEE :				
Syndrome de Job	N	N ou NT	N	AN
Diabète sucré				
Hypogamma-globulinémie				
DIVERSES :				
Syndrome de Wiskott-Aldrich				
Arthrite rhumatoïde				
Néoplasmes	N	N ou NT	AN	AN
Leucocytes avec granulations toxiques				

N = normal ; AN = anormal ; NT = non testé.

L'étude in vitro de la migration des polynucléaires, quelque soit les imperfections des méthodes, a apporté des données nombreuses sur l'identité et le mécanisme de formation des facteurs capables d'induire la chimiotaxie. Le parallélisme des résultats obtenus, d'autre part, avec les chambres cutanées permet de penser que les méthodes d'étude in vivo mettent bien en évidence la migration orientée des polynucléaires.

Cependant, il reste à mieux préciser dans quelles conditions ces substances chimiotactiques sont opérationnelles in vivo et dans quelle mesure les unes ou les autres participent à la reconnaissance des substances étrangères et quels mécanismes interviennent dans l'accumulation des polynucléaires au niveau des foyers inflammatoires.

Une meilleure connaissance des divers facteurs réglant *in vivo* la migration leucocytaire permettrait de mieux apprécier la signification des phénomènes observés *in vitro* (et, secondairement, de mettre au point des tests aptes à déceler des anomalies du mouvement des polynucléaires et leurs relations avec divers états pathologiques).

1.4.3. PHAGOCYTOSE - BACTERICIDIE -

La phagocytose, décrite par METCHNIKOFF dès 1905, est une propriété commune aux polynucléaires et aux macrophages qui permet à l'organisme de faire face aux agressions bactériennes.

Ce processus de phagocytose se déroule en quatre étapes distinctes :

- le chimiotactisme,
- l'opsonisation,
- l'ingestion,
- la dégranulation et la bactéricidie.

Nous allons envisager successivement ces trois dernières étapes, le chimiotactisme ayant été étudié précédemment dans le paragraphe 1.4.2.

- L'opsonisation :

L'opsonisation modifie les parois bactériennes et facilite l'ingestion des micro-organismes.

On distingue des opsonines thermolabiles (composants du complément) et des opsonines thermostables (les immunoglobulines).

Les immunoglobulines G et les complexes IgM-complément se fixent sur le phagocyte au niveau des récepteurs spécifiques (194).

Les IgG semblent responsables de la majeure partie de l'activité opsonisante du sérum chez le sujet hyperimmunisé, en particulier les classes IgG₁ et IgG₃ (153).

Les anticorps IgG fixés à leur antigène par le fragment Fab s'attachent par un site particulier de leur fragment Fc sur un site correspondant de la surface des phagocytes (115, 158).

Les anticorps IgM ne sont pas opsonisants par eux-mêmes, car dépourvus de tout site de fixation pour les phagocytes. Néanmoins, par leur capacité à fixer les quatre premiers composants de la voie d'activation classique du complément C₁, C₄, C₂ et C₃, ces anticorps peuvent devenir de puissantes opsonines.

Les anticorps IgA ne sont pas opsonisants du fait d'une impossibilité structurale : les fragments Fc ne sont pas libres, ils sont reliés par la pièce sécrétoire (158).

L'action opsonisante des anticorps nécessite la présence des fractions C₁, C₂, C₄ du complément (142).

Le contrôle de l'activité opsonisante de C₃ est réalisé par le C₃b inactivateur ou K.A.F. qui protéolyse C₃ en C₃c et C₃D (114).

Le C₃b augmente la vitesse d'ingestion par le polynucléaire, mais n'augmente pas l'affinité des particules pour le polynucléaire (209).

Les IgG agissent en augmentant les deux phénomènes (208). Certaines substances nommées opsonines non spécifiques telles que les protéines basiques, les histones, favoriseraient la phagocytose en agissant seulement sur les cellules.

La présence des opsonines est donc nécessaire pour la reconnaissance des antigènes et augmente la captation des micro-organismes en modifiant leur surface (213).

- Ingestion :

La bactérie opsonisée, qui est en contact avec la membrane du polynucléaire, est entourée par des pseudopodes ectoplasmiques et se trouve finalement isolée dans une vacuole ou phagosome.

Cette phase commence par une gélification de la zone hyaloplasmique dès que l'accolement est établi, et c'est par contraction de cette région que la particule est retenue.

La distribution des micro-filaments et des micro-tubules se modifie lors de la phagocytose.

Les micro-filaments de l'ectoplasme hyalin deviennent plus denses au niveau des pseudopodes, s'orientent en faisceau de 40 à 100 Å°. L'expansion des pseudopodes autour de la particule à phagocyter serait due à une polymérisation de l'actine.

La capacité de la phagocytose durant la maturation des précurseurs granuleux apparaît avec la perte des charges négatives de surface dues à l'acide sialique (116), mais son rôle est encore mal connu.

L'englobement nécessite de l'énergie qui est fournie par la glycolyse (39, 209) avec production d'ATP. Les cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++} , CO^{++} , Mn^{++}) augmentent la vitesse d'ingestion des particules opsonisées (159). Le Mg^{++} et le Ca^{++} sont indispensables dans le milieu extra-cellulaire.

Le traitement avec un agent chélateur comme l'EDTA réduit l'ingestion des hématies hétérologues (207).

L'intervention de l'AMPc, bien qu'encore mal connue, apparaît comme probable : les composés qui activent l'adényl-cyclase tels que l'épinéphrine et les prostaglandines PGE_1 et PGE_2 inhibent la phagocytose par accumulation d'AMPc dans le phagocyte (205).

Un facteur sérique, le TUFTSIN, décrit par NAJJAR en 1970 (144), stimule la phagocytose à très faible concentration par action directe sur le phagocyte, et non sur la particule cible. C'est un tétrapeptide synthétisé dans la rate et qui se lie à une gamma-globuline cytophile spécifique du leucocyte.

- Dégranulation et bactéricidie :

Après l'englobement de la particule et la formation de phagosome, deux faits importants sont à signaler :

- . la fusion des lysosomes avec le phagosome, donnant le phagolysosome ;
- . la dégranulation du phagocyte.

Grâce à la microscopie en contraste de phase et au microscope électronique, on sait maintenant que, dans un premier temps, il y a accolement de la paroi des lysosomes à celle de la vacuole de phagocytose. Les parois des lysosomes et de la vacuole fusionnent ensuite. La dégranulation est la conséquence de la fusion des lysosomes avec la vacuole de phagocytose (8).

Les granulations spécifiques riches en lactoferrine, collagénase, lysozyme, phosphatase alcaline, puis les granulations azurophiles riches en myéloperoxydase, hydrolases acides, lysozyme et protéines cationiques, déversent leurs enzymes dans le phagolysosome. Le pH passe rapidement de 7 à 4 (36), cette modification du pH est très importante car elle est bactéricide par elle-même.

Le mécanisme de la dégranulation ferait intervenir les micro-filaments et les micro-tubules (240, 241).

La GMPc stimule la sécrétion des enzymes lysosomiales, alors que l'AMPc inhibe cette sécrétion. L'atropine, la théophylline, inhibent la dégranulation. C'est la GMPc qui, associée au calcium, contrôlerait la dégranulation. Le calcium activerait la guanylate cyclase (95, 260).

Parallèlement à la dégranulation, se déroule toute une série de phénomènes biochimiques si étroitement liés à la mort et à la dégradation de l'agent pathogène qu'on pense qu'ils en sont responsables (212). On note une augmentation de la glycolyse et de la consommation d'oxygène (112, 211). Cette dernière est utilisée pour produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du superoxyde (O_2^-) par réduction monovalente de l'oxygène (45). Cette production d' O_2^- et d' H_2O_2 serait sous la dépendance d'une oxydase et d'un donneur d'électrons encore mal déterminé : le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) ou le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH).

L' H_2O_2 est bactéricide par lui-même, mais il l'est surtout en présence de myéloperoxydase et d'un halogène (113).

L'activité du shunt hexose monophosphate (AMP) est essentielle dans le métabolisme leucocytaire. Le déficit total en glucose 6-phosphate deshydrogénase (G_6PD) inhibe le shunt AMP et la bactéricidie. La régénération du NADP indispensable à l'activité de ce shunt peut être assurée par le NADPH oxydase, mais aussi par le système du glutathion et par le système pyruvate - lactate - lactico-déshydrogénase.

D'autres systèmes bactéricides indépendants de l'oxygène interviennent :

- . les protéines cationiques telles que : la phagocytine (92), la leukine (193),

- . la lactoferrine (255) qui a une activité bactériostatique en chélatant le fer nécessaire à la croissance des micro-organismes,
- . le lysozyme, par son action lytique sur les parois bactériennes. Il agit par rupture de la liaison bêta-1-4 de l'acide N-acétyl muramique et de la N-acétyl glucosamine,
- . le myéloperoxydase (182) agit en synergie avec le peroxyde d'hydrogène et un halogène.

Ainsi, le polynucléaire assure la phagocytose des micro-organismes au cours d'un processus physiologique complexe comportant une succession de phénomènes cellulaires, humoraux et métaboliques (figure 8) (48).

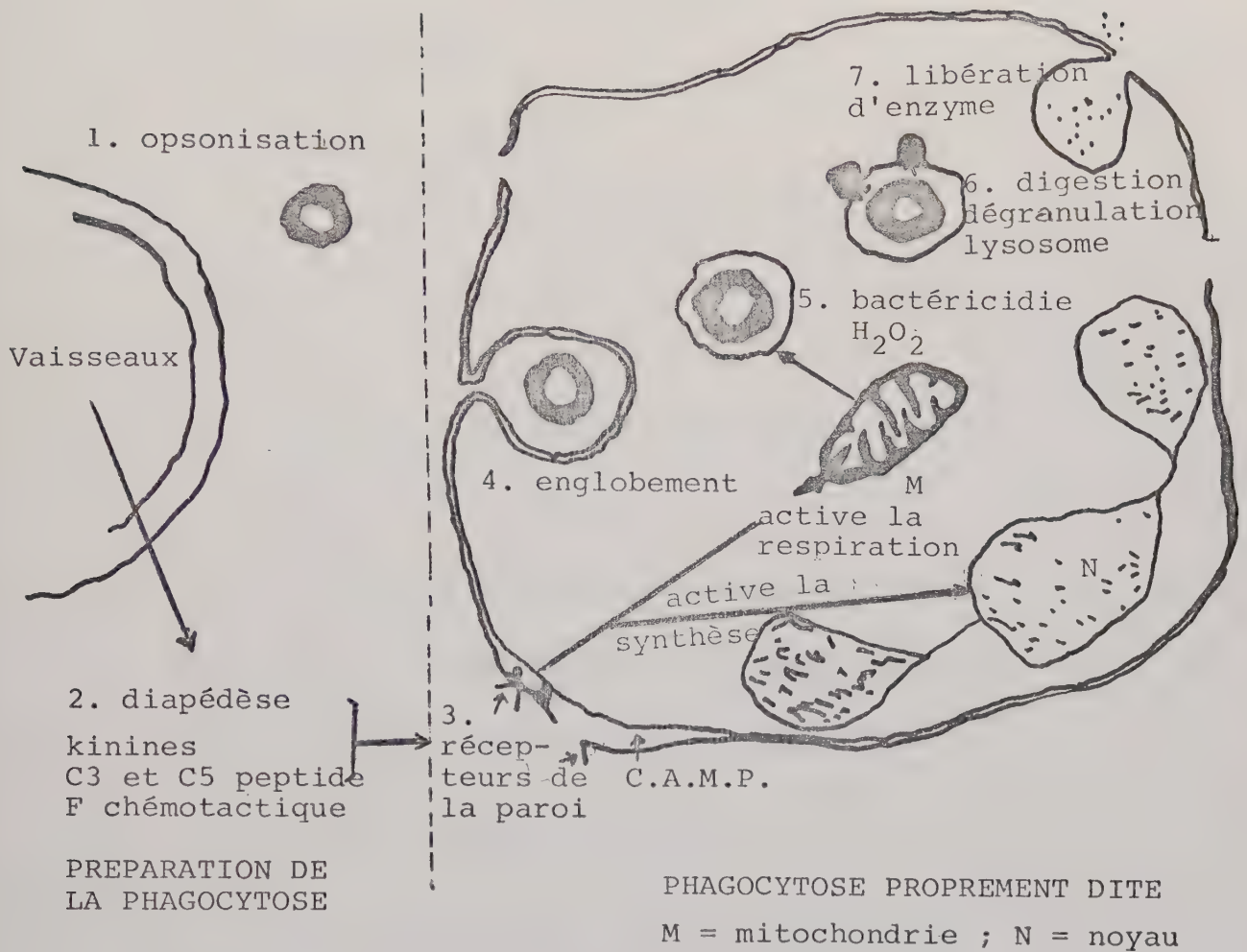


Figure 8 : DIFFERENTES ETAPES DE LA PHAGOCYTOSE (48)

2. LES MÉCANISMES DE L'INFLAMMATION

2.1. GENERALITES -

2.1.1. Définition.

2.1.2. Histologie.

2.1.3. Etiologie.

2.2. MECANISMES DE L'INFLAMMATION -

2.2.1. Les lysosomes.

2.2.2. Les médiateurs vaso-actifs.

2.2.3. Le système du complément sérique.

2.2.4. Le facteur Hageman XII.

2.2.5. Les prostaglandines.

2.3. MODE D'ACTION DES ANTI-INFLAMMATOIRES -

2.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.

2.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

2. LES MÉCANISMES DE L'INFLAMMATION

2.1... GENERALITES -

2.1.1. DEFINITION -

L'inflammation n'est pas un phénomène strictement local, comme l'avait déjà décrit CELSUS (42 av. J.C.), par ces quatre signes cliniques : rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur, et auxquels GALIEN rajoutait un cinquième critère : la perte de fonction (87). Ce tableau sous-entend au niveau de la lésion locale : vaso-dilatation, oedème interstitiel, accumulation des leucocytes, altérations ou nécrose des tissus (132).

L'inflammation est aussi une réponse de l'organisme à des agressions variées par des mécanismes divers impliquant des facteurs neurologiques, vasculaires, humoraux et cellulaires (60).

2.1.2. HISTOLOGIE DE L'INFLAMMATION -

L'inflammation aiguë se développe chronologiquement en trois phases, auxquelles fait suite une période de réparation :

- Phase vasculaire :

C'est une vaso-constriction qui est très rapidement suivie par une vaso-dilatation. Une stase sanguine s'installe dans les capillaires passivement dilatés. Simultanément, on note une perméabilité de l'endothélium vasculaire :

- . perméabilité liquidienne, à l'origine de l'oedème inflammatoire,
- . perméabilité de la paroi aux leucocytes.

- Phase d'exosérèse, de diapédèse leucocytaire :

Conséquence des phénomènes précédents.

L'oedème inflammatoire est le premier à se manifester, le liquide d'oedème contient des éléments du plasma, de la fibrine, du sérum et divers produits. Puis, arrivent des polynucléaires et, dans certains cas, des lymphocytes. Plus tard, les monocytes du sang circulant peuvent traverser la paroi vasculaire et gagner les tissus.

- Phase cellulaire locale :

A cet afflux leucocytaire s'ajoute, un peu plus tardivement, une production cellulaire locale : production d'histiocytes et de macrophages.

Les cellules ainsi déversées dans les tissus vont se mettre en rapport avec les agents d'agression et exercer la phagocytose.

Dans les infections aiguës, la réaction macrophagique est transitoire avec formation de pus.

Quand l'infection passe à la chronicité, la réaction macrophagique risque de se prolonger indéfiniment.

Au cours de cette phase, se constitue un processus d'encerclement du foyer inflammatoire.

- Phase de réparation :

Au cours de cette phase, on assiste à une organisation conjonctive du foyer, une prolifération fibroblastique avec synthèse de collagène et de mucopolysaccharides, matrice du nouveau tissu, une création des néo-vaisseaux.

En aucun cas, on ne doit séparer toutes ces activités, les phénomènes de réparation sont longtemps continents des phénomènes de destruction (87).

2.1.3. ETIOLOGIE DE L'INFLAMMATION :

Les agents de l'inflammation appelés aussi "stimuli phlogogènes" sont très nombreux et intéressent tous les chapitres de la pathologie :

- les bactéries contenant de multiples facteurs agressifs (protéases, toxiques, antigènes) ;
- les virus vivant à l'intérieur de la cellule et modifiant profondément ses fonctions ;
- les rickettsies, néorickettsies, champignons, parasites ;
- les agents physiques, traumatismes, corps étrangers (greffes d'organes), agressions thermiques et radiations ;
- agressions pharmaceutiques ;
- affections variées des articulations ;
- divers états d'anoxie tissulaire ;
- néoplasie (tumeur carcinoïde en particulier) ;
- substances toxiques (87) ;
- la mise en route d'un processus immunitaire vis-à-vis d'un antigène ou d'un auto-antigène : anaphylaxie, hypersensibilité retardée, réaction d'Arthus, maladie sérique, phénomène de Sanarelli-Schwartzman, maladies auto-immunes, rejet des greffes (132).

Malgré cette variété des stimuli capables d'induire une réaction inflammatoire, il est possible de définir les traits communs que revêtent le contrôle des mécanismes mis en jeu, le début et la fin de la réponse tissulaire, les substances qui sont les médiateurs de la réaction inflammatoire.

2.2... MECANISMES DE L'INFLAMMATION -

Les mécanismes de l'inflammation sont complexes et encore mal connus. Ils font intervenir différents intermédiaires dont :

- les enzymes libérées par les lysosomes ;
- les médiateurs vaso-actifs ;
- le système du complément sérique ;
- les facteurs de la coagulation ;
- les prostaglandines.

2.2.1. LES LYSOSOMES -

Les lysosomes, particules intra-cytoplasmiques décrites par DEDUVE (47), sont définies par leurs propriétés enzymatiques, leur aspect morphologique variable selon les états physiologiques et pathologiques de la cellule qui les contient. On les classe en quatre types fonctionnels :

- les granules de stockage ou lysosomes primaires ;
- les phagolysosomes et les lysosomes secondaires ;
- les vacuoles autophagiques ;
- le corps résiduel lysosomal.

Leur fonction essentielle est la dégradation et la digestion des substances intra et extra-cellulaires soit par des endocytoses (corps microbien par exemple), soit par "suicide" cellulaire, soit par résorption des particules altérées ou sénescents (239).

Cette fonction est assurée grâce à un équipement enzymatique très complet, toutes les voies métaboliques principales sont présentes (64) :

- des nucléases : acide ribonucléase, acide désoxyribonucléase ;
- des phosphatases : phosphatases acides, phosphodiesterase ;
- des protéases et peptidases : cathepsines A, B, C, D, collagénase, peptidases, arylamidase ;

- les enzymes dégradant les glucoses aminoglycanes, lysozyme, hyaluronidase, bêta-glucuronidase ;
- les enzymes hydrolysant les chaînes carbohydrates des glycoprotéines et glycolipides : bêta-galactosidase, bêta-glucosidase, N-acétyl-hexosaminidase, sialidase ;
- les enzymes dégradant les lipides : phospholipase, catérase, glucocérébrosidase ;
- les enzymes activatrices de peptides : plasminogène, kiminogène ou bradykiminogène (132).

Au repos, ces enzymes sont retenues à l'intérieur des lysosomes ; leur activité lytique ne se manifeste pas, mais dès que les granules de stockage adhèrent par leur paroi à la vacuole de digestion (phagosome), la membrane lysosomiale devient perméable et aboutit à la diffusion des enzymes dans le phagosome, on aboutit donc à un phagolysosome. Le même phénomène se produit avec les mitochondries : dans ce dernier cas, on aboutit à une vacuole autophagique qui constitue le lieu de digestion au même titre que le phagolysosome (87).

Dans certains cas pathologiques, en particulier lors d'agression par des agents inflammatoires, les enzymes lytiques sont libérées dans la cellule et créent des lésions conduisant à la mort cellulaire et, de proche en proche, à des dégâts tissulaires souvent irréversibles.

Les produits de dégradation cellulaire devenant antigéniques, ils sont captés par les lymphocytes et conduisent à l'élaboration d'anticorps (auto-anticorps, maladies auto-immunes, polyarthrite rhumatoïde).

Ces lysosomes contiennent certaines substances susceptibles de produire une inflammation, citons :

- une protéase cationique pouvant rompre les granules des mastocytes ;
- diverses protéases pouvant soit accroître la perméabilité capillaire, soit avoir une activité destructrice sur les mucopolysaccharides du cartilage.

La figure 9 résume les divers stades évolutifs des lysosomes. Nous distinguons :

- les lysosomes des polynucléaires ;
- les lysosomes des cellules mononucléées.

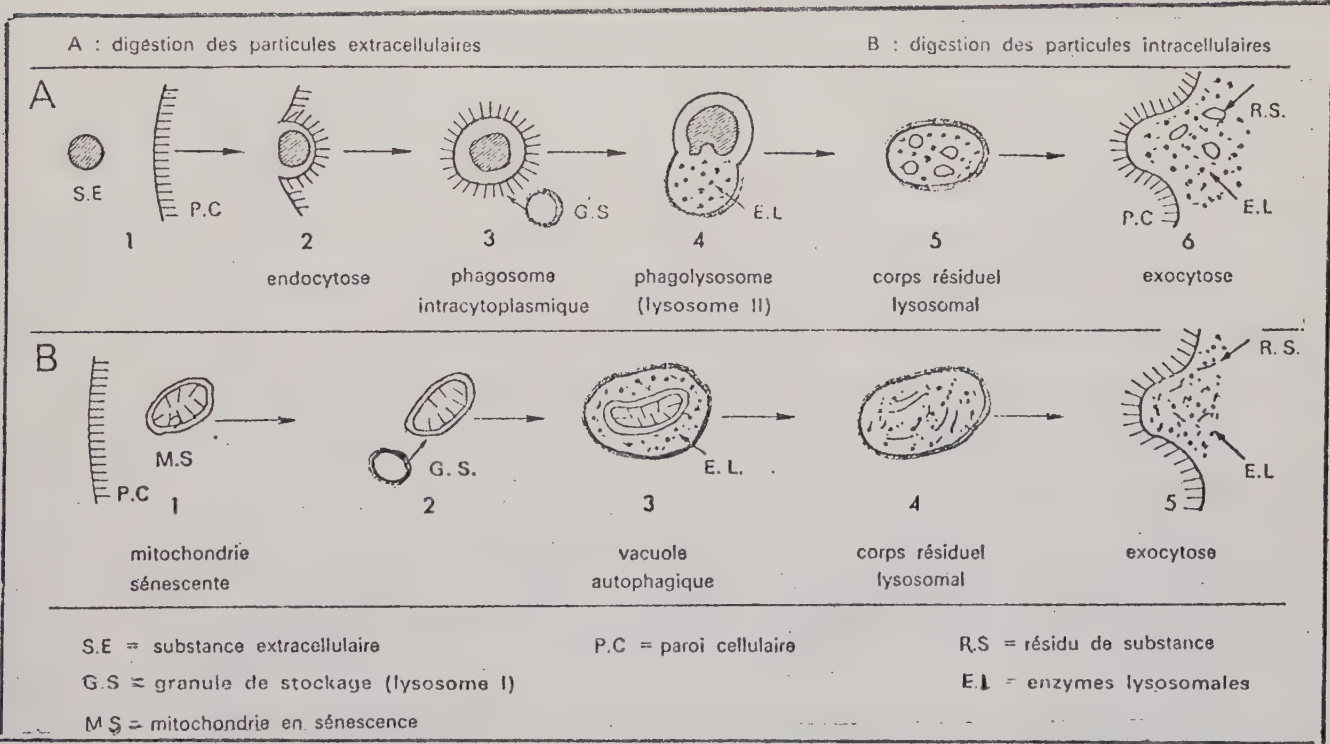


Figure 9 : DIVERS STADES EVOLUTIFS DES LYSOSOMES (132)

- Les lysosomes des polynucléaires :

Les lysosomes des polynucléaires sont représentés par des granulations éosinophiles et neutrophiles.

Les polynucléaires, par leur activité phagocytaire et de digestion des particules, assurent un rôle de défense des tissus envahis par un processus infectieux, mais il arrive que la libération de ces mêmes substances est à l'origine de lésions tissulaires importantes.

Donc, au cours de l'inflammation, ces agents peuvent avoir :

- . une action favorable : lutte contre l'agent causal ;
- . une action néfaste : altérations tissulaires.

. Action favorable :

C'est la lutte contre l'agent causal et qui consiste en l'ingestion, la mise à mort et la digestion des micro-organismes. Face à l'agent extérieur (bactérie, champignon), la vacuole de phagocytose ou d'endocytose se constitue et, dès que le phagosome contenant le corps étranger est élaboré, les lysosomes primaires viennent s'accoler à lui et y déverser leurs nombreuses enzymes lytiques. Nous en citons une myéloperoxydase (211,254) qui, en présence d'eau oxygénée, oxyde certains constituants intracellulaires pour former un composé léthal pour la bactérie ingérée.

Quant à la digestion des particules, elle est facilitée par l'activation des enzymes hydrolytiques qui est due à la baisse du pH dans le foyer inflammatoire (64).

. Action néfaste :

C'est l'altération tissulaire. En effet, au cours de leur lutte contre les micro-organismes, de nombreux polynucléaires succombent, les enzymes qu'ils contiennent se répandent dans les tissus environnants. Certaines de ces enzymes constituent des éléments très actifs de l'inflammation soit directement, soit en tant qu'activateurs de

systèmes biologiques fortement phlogogènes : médiateurs vaso-actifs, complément sérique, facteur XII Hageman, facteurs de coagulation et de fibrinolyse (87, 132).

Certains stimuli sont particulièrement nocifs pour les polynucléaires, tels que les micro-cristaux d'urate. La phagocytose de ces micro-cristaux induit non seulement la libération d'enzymes lysosomiales, mais également d'une substance chimiotactique particulière qu'accentue encore le phénomène inflammatoire (157).

Il a été montré expérimentalement que si l'on prévient l'accumulation des polynucléaires dans les tissus affectés, on note une réduction très significative des lésions. On dit que la réaction tissulaire est "polynucléaire dépendante" (97). Trois modèles de ce type de réaction, de nature immunologique, ont été décrits : la glomérulonéphrite aiguë, le syndrome artéritique de la maladie sérique et le phénomène d'Arthus (24, 37).

On peut penser que les drogues qui réduisent les altérations tissulaires doivent une grande part de leur efficacité au fait qu'elles diminuent la mobilité des polynucléaires et leur diapédèse : colchicine (123), indométhacine (156).

La figure 10 représente les principales substances localisées au niveau des lysosomes des polynucléaires et qui jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire (132).

La fragilisation des lysosomes des granulocytes et la diffusion des estérases qu'ils contiennent augmentent l'afflux d'autres leucocytes et polynucléaires vers le lieu d'inflammation (60).

Les produits de dégradation du collagène semblent être les principaux médiateurs de l'infiltration cellulaire.

SUBSTANCE	PRINCIPALE ACTION
1. — Histamine	vaso-dilatation
2. — Facteur de dégranulation des mastocytes (MCF)*	libération d'histamine
3. — SRS-A**	stimulation muscle lisse
4. — Kininogénases	activateurs du système bradykinine
5. — Facteur pyrétogène	fièvre d'où vaso-dilatation
6. — Facteur chimio-tactique	migration des monocytes
7. — Estérases chimio-tactiques	migration des leucocytes par clivage de C'3 et à partir de C'5
8. — Cathepsines acides	protéolyse - attaquent la basale vasculaire à pH acide
9. — Leucoprotéase	protéolyse - attaque la basale vasculaire à pH neutre
10. — Collagénase	clivage de la molécule de collagène-destruction du tissu conjonctif
11. — Elastase	dégradation de l'élastine, attaque les mucopolysaccharides du cartilage et la basale des vaisseaux
12. — Mucopolysaccharidase	destruction de la substance fondamentale du cartilage
13. — Facteur anti-héparine	facteurs pro-coagulants
14. — Facteur précipitant des complexes solubles de monomères de fibrine	
15. — Activateur du plasminogène	facteur pro-fibrinolytique

* MCF : mastocytolytic factor
 ** SRS-A : slow reacting substance of anaphylaxis

Figure 10 : QUELQUES SUBSTANCES LOCALISEES AU NIVEAU DES LYSOSOMES DES POLYNUCLEAIRES, D'ACTIVITE "PHLOGOGENE" INDUBITABLE (132)

- Les lysosomes des cellules mononucléées :

Les cellules mononucléées caractérisent le stade secondaire de l'inflammation aiguë et l'établissement d'un état inflammatoire chronique de nature immunologique.

Comme pour les polynucléaires, les lysosomes des cellules mononucléées sont activables par les même stimuli, ils libèrent les enzymes lytiques de même type :

- . Parmi les monocytes, on distingue les mastocytes, cellules répandues dans le tissu conjonctif et surtout autour des vaisseaux.

Les lysosomes qu'elles contiennent sont riches en histamine, sérotonine, dopamine, héparine ...

La dégranulation des mastocytes provoquée par des stimuli directs sur la surface cellulaire - et par des stimuli indirects dus aux modifications chimiques et physico-chimiques des tissus qui sont le siège de l'inflammation - a pour conséquence la libération de substances biologiquement actives, parmi lesquelles l'histamine qui a une importance particulière dans l'inflammation.

- . Les lymphocytes, nés dans la moelle, migrent vers le thymus où ils subissent une différenciation antigénique, et ils deviennent "immunocompétents", c'est-à-dire capables de reconnaître certains antigènes, puis, par le système lymphatique, arrivent dans la circulation. Lors de leur rencontre avec l'antigène correspondant, ils prennent un aspect lymphoblastique et donnent des petits lymphocytes spécifiquement sensibilisés.

Lorsqu'ils sont à nouveau en présence de l'antigène, ils subissent des modifications morphologiques importantes et deviennent plus riches en lysosomes que les lymphocytes non sensibilisés.

Ils libèrent alors plusieurs médiateurs lymphocytiques :

- . les uns sont directement nocifs pour les cellules qui sont en contact avec les lymphocytes : ce sont les facteurs cytotoxiques : d'inhibition de prolifération et d'inhibition de synthèse ;
- . les autres sont actifs sur les monocytes, tel que le facteur chimiotactique qui attire les monocytes et les agrège autour du lymphocyte. Le MIF (migrator inhibitory factor) immobilise les monocytes d'endothélium vasculaire qui, activés, se transforment en macrophages. Ces macrophages pénètrent dans la paroi vasculaire et y déversent leurs enzymes lysosomiales qui interviennent dans les lésions inflammatoires (149).

Ainsi, les cellules phagocytaires jouent un rôle considérable dans la réaction inflammatoire. En effet, mis à part les conséquences favorables (digestion et élimination des substances étrangères), le rôle important et nocif de la phagocytose a été démontré par COCHRANE dans le phénomène d'Arthus (38) et par HALPERN dans le phénomène de Schwartzman (85). Dans ces deux cas, les lésions sont dues à la libération des enzymes lysosomiales par les cellules phagocytaires.

On sait actuellement que toute substance qui empêche la chimiotaxie et la diapédèse, qui stabilise le lysosome ou qui inhibe les enzymes lysosomiales (156, 222), a une action préventive sur les lésions hémorragiques et nécrotiques de ces phénomènes (98). D'où l'intérêt de la thérapeutique par inhibiteur d'enzymes en rhumatologie (168).

A côté de ces mécanismes cellulaires, se produisent des modifications humorales. Nous envisagerons :

- les médiateurs vaso-actifs,
- le système du complément,
- le facteur Hageman XII,
- les prostaglandines.

2.2.2. LES MEDIEURS VASO-ACTIFS -

Les médiateurs vaso-actifs de l'inflammation sont libérés sous le contrôle des systèmes nerveux et endocrinien. Ils exercent une action locale et à distance :

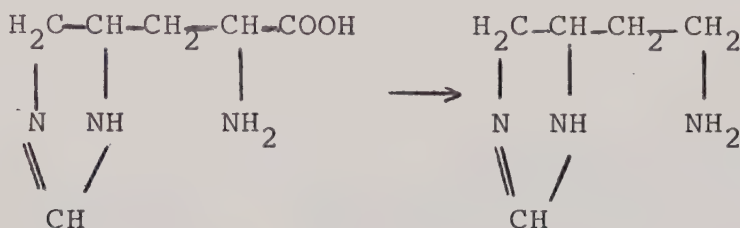
- L'action locale se traduit par une vaso-dilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire, par une action directe sur les leucocytes ; en effet, on sait que la bradykinine, à certaines concentrations, augmente la motilité des polynucléaires et surtout des macrophages. De même, il semble que la bradykinine est capable d'entraîner la division de certains lymphocytes (60) ;
- A distance, à leur action pyrogène s'ajoute une action sur la moelle osseuse. En effet, in vitro, la bradykinine et l'histamine seraient capables de modifier dans des cultures de moelle osseuse la différenciation des cellules souches.

Parmi les médiateurs vaso-actifs, on distingue :

- l'histamine,
- la sérotonine,
- la "slow reacting substance of anaphylaxis" ou SRSA,
- la bradykinine.

- L'histamine :

L'histamine a une origine essentiellement endogène ; elle provient de la décarboxylation enzymatique de l'histamine :



L'histamine est présente dans tous les tissus à des concentrations d'autant plus élevées que la richesse en mastocytes est plus importante. A citer : le poumon, le foie, la peau, les hématies, les polynucléaires, les plaquettes.

L'histamine est contenue dans les granulations métachromatiques des mastocytes et des péricytes capillaires. Elle s'y trouve associée à des substances acides comme l'héparine sous la forme d'un complexe inactif (60, 87, 132).

De nombreux processus et de nombreuses substances sont susceptibles de libérer l'histamine :

- . des enzymes protéolytiques ;
- . des substances macro-moléculaires tel que le dextran ;
- . le MCF (mastocytolytic factor) contenu dans les lysosomes des polynucléaires qui, après activation, provoque la rupture de la membrane des mastocytes ;
- . le système du complément sérique et surtout l'anaphylatoxine (88).

- . la plasmine ;
- . les complexes antigène-anticorps, en particulier lorsque l'anticorps est une IgE (96) ;
- . la faible teneur en AMP cyclique cellulaire ;
- . les prostaglandines (pGE_1 et pGE_2) (60) ;

L'histamine, une fois libérée, à part son action sur les sécrétions, joue un rôle fondamental dans l'inflammation en agissant sur les fibres lisses. En effet, cette action se traduit par une augmentation de la pression intra-capillaire, d'où augmentation de la perméabilité avec fuite liquidienne dans les espaces lacunaires (oedème) et hémocoagulation (87).

- La sérotonine :

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine provient de la décarboxylation enzymatique du 5-hydroxytryptophane.

La sérotonine se localise dans les plaquettes sanguines, mastocytes, péricytes. Le mécanisme de sa libération est mal connu, il semble qu'il soit en relation avec la dégranulation des mastocytes.

Son rôle essentiel est de provoquer une vaso-constriction veineuse, tandis que son rôle dans l'inflammation est très discuté (87, 132).

- "Slow reactive substance of anaphylaxis" (SRSA) :

La SRSA est une substance lipidique acide décrite en 1940 par KELLAWAY et TRETHEWIE (148). Elle est contenue dans le tissu pulmonaire de sujets allergiques, les muscles bronchiolaires humains, les mastocytes, péricytes, ainsi que dans les granules lysosomiaux des polynucléaires, surtout neutrophiles.

La libération de la SRSA se fait sous l'action de complexes immuns formés par l'antigène et l'anticorps IgE. Elle produit une contraction prolongée de la fibre lisse bronchique (87).

Son rôle dans l'inflammation est connu depuis peu (132).

- La bradykinine :

La bradykinine est le médiateur vaso-actif le plus puissant de l'inflammation (15 fois plus que l'histamine). Elle appartient à un groupe de polypeptides vaso-dilatateurs : les kinines. On distingue :

- . la kallidine primaire ou bradykinine, c'est un mono-peptide ;
- . la kallidine secondaire II ou lysil-bradykinine, c'est un décapeptide.

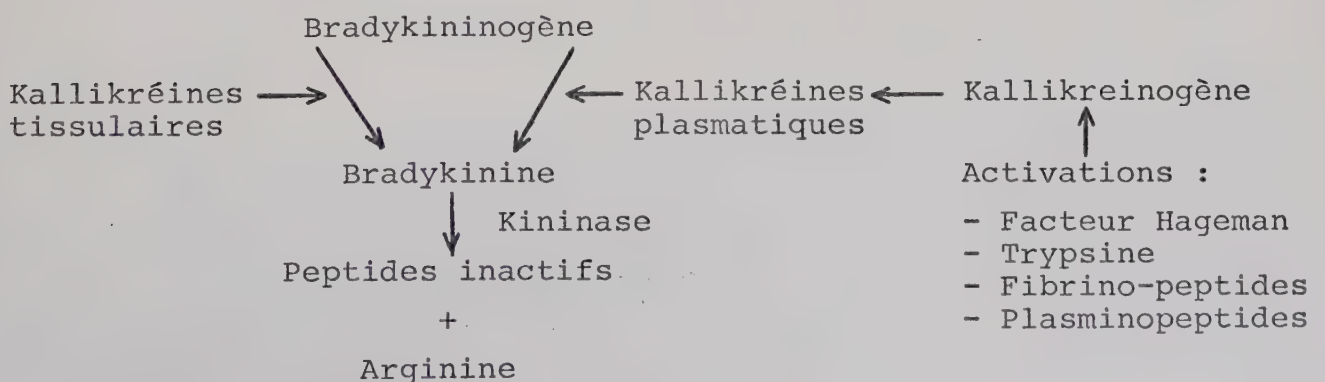
Ces substances résultent de l'hydrolyse d'une α_2 -globuline plasmatique, le bradykininogène, par une enzyme : la kallikréine dont il existe une forme plasmatique et une forme tissulaire.

La forme plasmatique résulte de l'activation d'un précurseur inactif : le kallikreinogène, par le facteur XII Hageman, la trypsine et la plasmine.

La bradykinine formée est rapidement dégradée par des kininases. Elle joue un rôle important dans l'inflammation :

- . elle est l'un des plus puissants vaso-dilatateurs capillaires ;
- . elle est responsable donc d'une stase capillaire et d'une agumentation de la perméabilité capillaire ;
- . la bradykinine, à forte dose, accroît l'adhérence des leucocytes aux parois vasculaires et favorise leur diapédèse (84) ;
- . elle est l'un des agents algogènes les plus puissants.

On peut récapituler l'activité inflammatoire de la bradykinine : (87) :



2.2.3. LE SYSTEME DU COMPLEMENT SERIQUE -

Le complément, découvert par BORDET en 1896, est un système biologique complexe formé par des globulines sériques et dont l'activation séquentielle se fait selon deux voies principales (126, 177) : la voie classique et la voie alterne qui se rejoignent en un tronc commun terminal (figure 11).

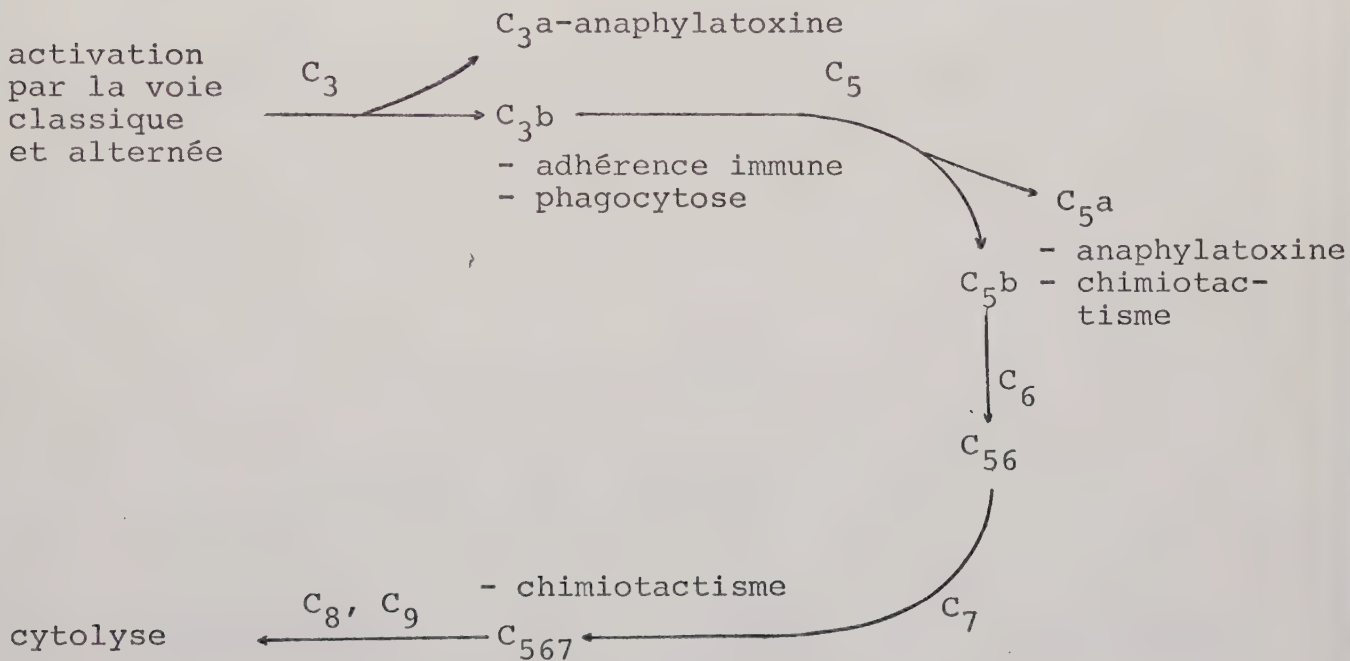


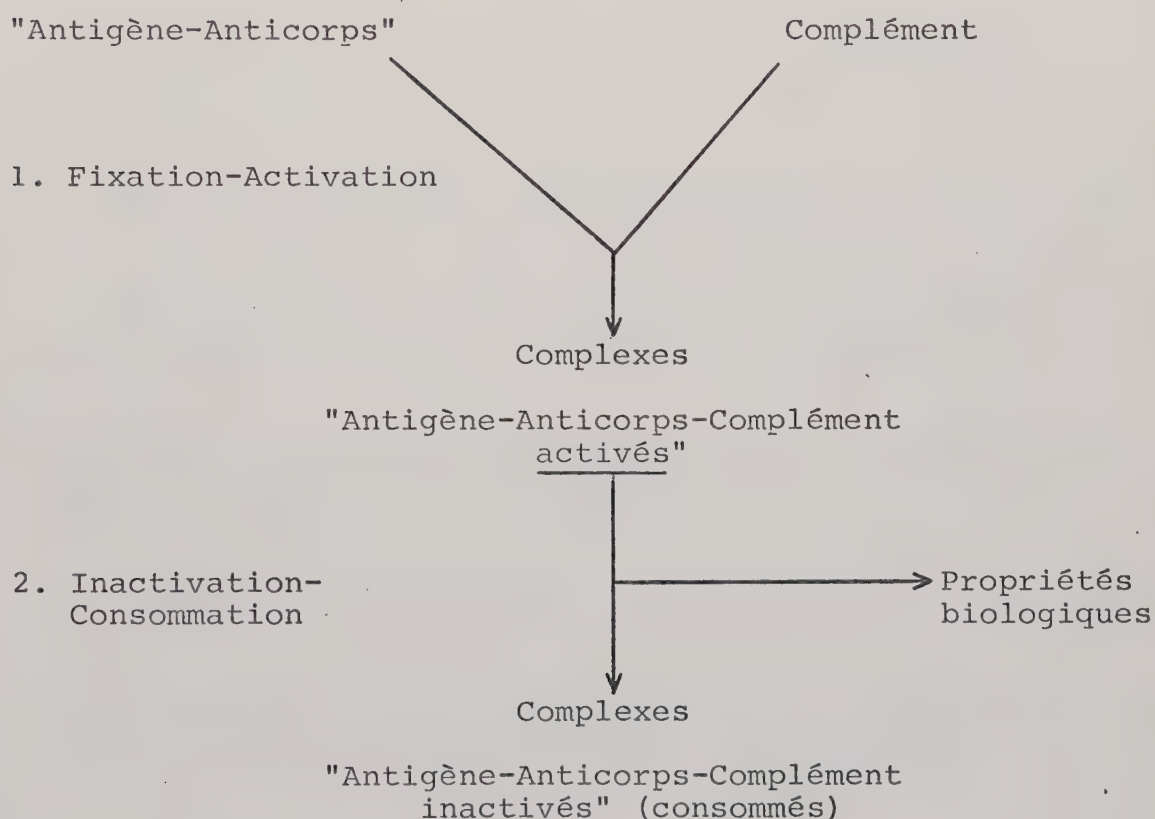
Figure 11 : ACTIVATION SEQUENTIELLE DU COMPLEMENT.

La mise en jeu du système de C peut avoir un point de départ immunitaire (réaction antigène-anticorps) ou non immunitaire - notamment par contact avec une endotoxine.

Le complément est considéré actuellement comme étant formé de neuf composants désignés par la lettre C suivie d'un chiffre (de 1 à 9) et qui se regroupent en trois unités fonctionnelles :

- C_1 ou unité de reconnaissance ;
- C_4 , C_2 et C_3 , ou unité d'activation ;
- C_5 , C_6 , C_7 , C_8 et C_9 , ou unité d'attaque de la membrane (154).

La plupart des composants du C sont doués de propriétés enzymatiques latentes : ils circulent dans le sérum à l'état de pro-enzymes, transformées en enzymes actives lors des réactions "antigène + anticorps + complément", ceci suivant un schéma général (152).



Ces diverses fractions du C peuvent être activées par plusieurs facteurs pour réagir successivement dans un ordre déterminé :

- la fraction C_1 est elle-même constituée de trois sous-fragments : C_{1q} , C_{1r} , C_{1s} , unis entre eux par un ion calcium. Les activateurs de C_1 sont :

- . les complexes immuns, stimuli les plus classiques de l'inflammation,
- . la plasmine,
- . le facteur XII.

La présence du complexe immun antigène-anticorps a pour effet d'activer C_1 s en C_1 estérase qui est à l'origine de la réaction en chaîne d'activation d'une fraction par une autre.

La C_1 estérase active les fractions du C, elle peut aussi activer le bradykinogène en bradykinine.

- Le C_3 activé par la C_1 estérase en présence de C_2 et C_4 intervient dans :
 - . la phagocytose des germes pathogènes et complexes immuns par les polynucléaires et les macrophages ;
 - . l'immuno-adhérence de micro-organismes à la membrane cellulaire ;
 - . la fraction C_3 est un des médiateurs du chimiotactisme des polynucléaires et des macrophages ;
 - . l'association C_1 estérase avec C_2 - C_4 scinde C_3 en plusieurs fragments, dont l'anaphylatoxine qui est capable de provoquer la dégranulation des mastocytes et des péricytes avec libération d'histamine.
- C_5 , comme C_3 , libère directement l'anaphylatoxine, et donc l'histaminé, favorisant par la vaso-dilatation qui en résulte l'accès des composants cellulaires et humoraux sur les lieux d'agression.
- La fraction C_7 renforce le chimiotactisme de C_3 sur les polynucléaires neutrophiles.
- C_8 et C_9 sont responsables de la lyse cellulaire et de la destruction des tissus lésés, tout en libérant les médiateurs les plus puissants de l'inflammation.

2.2.4. FACTEUR HAGEMAN XII -

Le facteur XII se trouve à l'état inactif dans le plasma. Son activation a pour conséquence le déclenchement de divers systèmes biologiques :

- Dans les phénomènes de la coagulation, le facteur XII, activé par une paroi de verre, est à l'origine du déclenchement des séquences de la coagulation. Cette activation consiste, semble-t-il, en un changement de charges électro-cinétiques des molécules initiales qui se polymérisent et précipitent (132).

- Dans les phénomènes de la fibrinolyse, associé à un cofacteur, il transforme le plasminogène en plasmine, capable de lyser fibrine et fibrinogène.
- En rapport direct avec l'inflammation, le facteur XII activé :
 - . élabore une substance protéolytique active sur la perméabilité vasculaire : le P.F./dil. Cette substance est capable de transformer le kallikréinogène en kallikréine, substance vaso-active ;
 - . agit directement sur le système de la bradykinine.
- Enfin, le facteur XII est l'un des activateurs du système du C soit directement, soit par l'intermédiaire de la plasmine.

L'activation du facteur XII se produit dans deux circonstances :

- toute altération de l'endothélium vasculaire, toute rupture de la continuité de la paroi vasculaire, entraînent la perte du caractère de non-mouillabilité de cette paroi et provoque l'activation du facteur XII ;
- présence de plusieurs substances activatrices du facteur XII :
 - . les mucopolysaccharides du cartilage altéré (32). D'ailleurs, le facteur XII inactif, les précurseurs du P.F./dil. et la kallikréine existent à l'état inactif dans le liquide synovial ;
 - . les cristaux d'urate de sodium sont des activateurs directs du facteur XII qui active à son tour les trois systèmes de la coagulation, de la fibrinolyse des kinines, et libère au sein du liquide synovial des goutteux des substances phlogogènes responsables du développement de la crise aiguë (189) ;
 - . d'autres corps insolubles (carbonate de baryum, talc, kaolin ...) et solubles (sulfate de cellulose, carragénine) sont aussi des activateurs du facteur XII.

Reste à insister sur les interactions entre inflammation et coagulation :

- Un grand nombre de stimuli de l'inflammation possèdent de puissantes propriétés thrombogènes.
- Les conditions locales de l'inflammation sont très proches de celles favorisant la thrombose :
 - . ralentissement circulatoire, stase capillaire ;
 - . perte du caractère de non-mouillabilité, anoxie.

Donc le processus inflammatoire induit par une agression quelconque est le résultat de l'activité d'un ensemble de systèmes phlogogènes (lysosomes, médiateurs vaso-actifs, phénomènes immunologiques et phénomènes de coagulation). Ainsi, la figure 12 représente l'ensemble des systèmes mis en jeu au cours de l'inflammation.

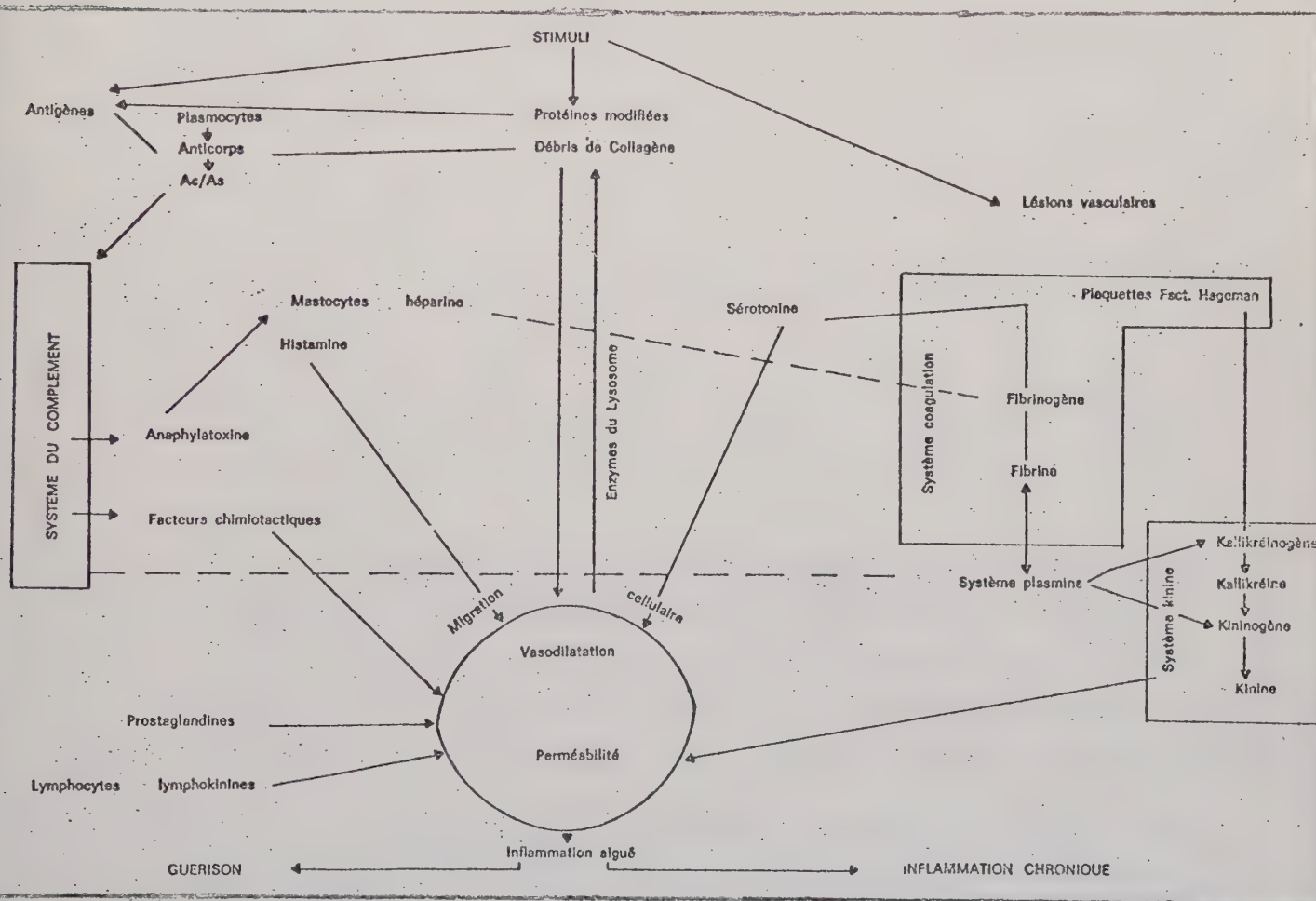


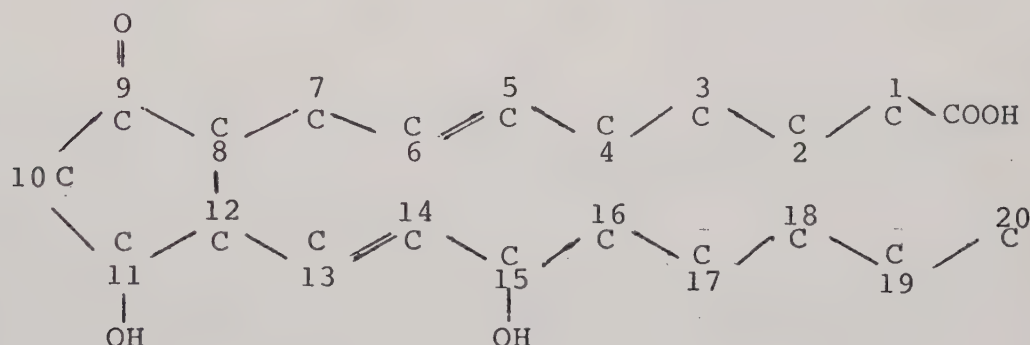
Figure 12 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIVERS SYSTEMES MIS EN JEU AU COURS DE L'INFLAMMATION (87)

2.2.5. LES PROSTAGLANDINES -

Les prostaglandines isolées à l'origine du liquide séminal, puis des exsudats des foyers inflammatoires, sont des dérivés de l'acide prostanoïque qui, lui-même, provient des acides gras.

On connaît aujourd'hui plusieurs familles de prostaglandines, toutes dérivées de l'acide prostanoïque. Elles se différencient par :

- leur noyau cyclopentanique ;
- le nombre de doubles liaisons présentes dans les chaînes latérales ;
- leur stéréo-chimie.



La synthèse des prostaglandines se fait dans les tissus à partir d'acides gras poly-insaturés, tel que l'acide arachidonique. Elles se distribuent dans de nombreux tissus : tissu reproducteur masculin et féminin, système nerveux central, tube digestif, reins, tissu adipeux.

Les plaquettes humaines peuvent libérer la PGE_1 et la PGF_2 -alpha sous l'influence de la thrombine (60). Le complément jouerait un rôle important dans la formation et la libération des prostaglandines (87).

Les prostaglandines sont rapidement inactivées par déshydrogénation, réduction, oxydation, en particulier au niveau des poumons et du foie.

Le rôle des prostaglandines dans l'inflammation obéit à des mécanismes complexes mal connus ; cependant, on a constaté :

- qu'elles sont présentes à des taux élevés dans les tissus inflammatoires (49) ;
- qu'elles augmentent la perméabilité vasculaire et que PGE_1 et PGE_2 entraînent une dégranulation des mastocytes avec libération d'histamine (60) ;
- qu'elles ont un effet algogène et hyperthermisant (86) ;
- de même, il est démontré que l'injection de prostaglandine E_1 reproduit certains signes de l'inflammation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'effet chimiotactique sur les polynucléaires, déterminants dans la première phase de la réaction inflammatoire. (49).

D'autre part, ces mêmes prostaglandines paraissent avoir, à l'opposé, une activité anti-inflammatoire dans certaines conditions expérimentales :

- Des études faites par WEISSMANN (1971) (239) sur la phagocytose des leucocytes in vitro montrent que les prostaglandines diminueraient la libération des enzymes lysosomiales par action sur l'AMP cyclique.

PGE_1 agit donc comme les anti-inflammatoires qui stabilisent la membrane des lysosomes par l'intermédiaire, peut-être, d'une augmentation du taux d'AMP cyclique dans les polynucléaires, car l'addition de celui-ci au milieu inhibe le phénomène (49).

- L'effet suppressif de la prostaglandine E_1 sur la polyarthrite à adjuvant du rat a été signalé par ZURIER (1973) (259).

On pourrait donc voir d'après DELBARRE (49), dans ces résultats contradictoires, une auto-régulation du processus inflammatoire par inhibition en retour "feed-back" : les prostaglandines seraient pro-inflammatoires à faible concentration (au début de leur synthèse sous l'effet d'un stimulus) et anti-inflammatoires aux taux plus élevés, suffisants pour inhiber la libération des médiateurs de l'inflammation, dont les prostaglandines.

2.3... MODE D'ACTION DES ANTI-INFLAMMATOIRES -

Bénéfiques dans la mesure où ils assurent la défense de l'organisme, les phénomènes inflammatoires sont, au contraire, fort préjudiciables lorsque leur intensité ou leur durée prennent des proportions importantes ; ils sont alors responsables de symptômes fonctionnels et de lésions organiques.

Dès lors, leur contrôle par une thérapeutique appropriée se justifie. Elle est le fait des médicaments anti-inflammatoires.

Il serait donc intéressant de rappeler le rôle des différents anti-inflammatoires sur les manifestations essentielles de l'inflammation. Classiquement, on classe les anti-inflammatoires en deux grands groupes chimiques : stéroïdiens et non stéroïdiens.

2.3.1. LES ANTI-INFLAMMATOIRES STERODIENS -

Classe assez homogène dont le type est la cortisone :

- les corticoïdes agissent sur le premier stade de l'inflammation. Cette propriété se retrouve dans des affections de caractère exsudatif, que celles-ci soient externes (eczémas suintants) ou qu'elles touchent des séreuses (synoviale, plèvre ...) (8) ;
- ils empêchent la libération des enzymes lysosomiales par stabilisation des membranes cellulaires (245) ;
- mais la relative inefficacité des corticoïdes sur le système des prostaglandines laisse supposer pour eux un mode d'action indépendant des prostaglandines (49).

2.3.2. LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STERODIENS -

Classe très hétérogène qui comporte : les dérivés salicylés, pyrazoliques, indoliques, les sels d'or, les aminoquinoléines, les dérivés de l'acide anthranilique, de l'acide phényl-propionique, etc...

Ces anti-inflammatoires agiraient sur la phase terminale de l'inflammation ; ils ont le pouvoir de réduire la biosynthèse des prostaglandines en inhibant la prostaglandine synthétase (52, 68, 87, 223).

De nombreux travaux ont été récemment consacrés à l'étude des prostaglandines dont certaines ont une activité phlogogène et d'autres sont antiphlogogènes. L'aspirine et l'indométhacine inhibent la synthèse des prostaglandines phlogogènes (49,129). On a récemment insisté sur le fait que l'aspirine inhibe l'enzyme permettant la transformation de l'acide arachidonique, précurseur de la prostaglandine E_2 (59) :

- Ces drogues affecteraient la migration spontanée in vitro des leucocytes (245), leur migration à travers un filtre millipore, la phagocytose des monocytes.
- Elles inhiberaient la libération des enzymes lysosomiales par action sur la surface des cellules mononucléées (52).
- Par leur activité antibradykinine, elles s'opposent à la vaso-dilatation synoviale responsable de l'épanchement articulaire.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. MATERIELS -

1.1.1. LES SUJETS ETUDIES

1.1.2. LES MEDICAMENTS TESTES

1.2. METHODES -

1.2.1. MIGRATION EN TUBE CAPILLAIRE

1.2.2. CHIMIOTACTISME

1.2.3. ETUDE STATISTIQUE

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. MATERIELS

1.1.1. LES SUJETS ETUDIES -

Les sujets étudiés sont des témoins sains choisis dans le cadre de l'Institut Pasteur de Lyon ; ils appartiennent aux deux sexes et ils sont d'âges variés (entre 25 et 50 ans).

Ils n'ont été soumis à aucun traitement thérapeutique préalable récent.

Le prélèvement sanguin s'effectue au pli du coude, à jeûn, dans un flacon hépariné (600 μ l pour 30 ml).

La formule sanguine est pratiquée systématiquement chez tous les donneurs pour s'assurer qu'elle est normale.

1.1.2. LES MEDICAMENTS TESTES -

Dans cette étude, deux antiinflammatoires appartenant à la classe des non stéroïdiens sont utilisés :

- le Kétoprofène est choisi comme représentatif du groupe des benzophénones,
- l'acide acétyl salicylique est le médicament type des salicylés.

Il nous a paru également intéressant d'étudier l'action d'un antalgique non antiinflammatoire : le tiemonium.

Nous avons voulu également testé l'action d'un immunostimulant non spécifique : le lévamisole.

- Le Kétoprofène :

Le Kétoprofène est commercialisé sous le nom de "profenid" (forme injectable. C'est un antiinflammatoire non stéroïdien dérivé de la benzophénone.

Sa structure chimique est l'acide (benzol 3 phényl) 2 propionique. La dose thérapeutique est de 50 mg par prise, et de 100 mg par jour.

Nous avons calculé la dose d'utilisation (dilution finale) à partir de la dose thérapeutique ramenée au ml de sang corporel (5 litres pour un adulte). La concentration sanguine rapportée à une prise est de 10 µg/ml, tandis que celle rapportée à la prise journalière est de 20 µg/ml.

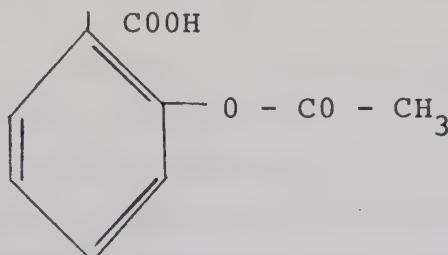
Dans le test de la migration spontanée en tube capillaire les doses utilisées sont : 20 - 50 - 100 - 200 - 500 µg/ml.

Dans le test du chimiotactisme, une seule dose est utilisée : 50 µg/ml.

- L'acide acétyl-salicylique :

Nous utilisons l'acétyl salicylate de lysine commercialisé sous le nom d'"Aspegic" (forme injectable).

C'est un antiinflammatoire non stéroïdien appartenant au groupe des salicylés. Sa formule chimique est :



Structure chimique de l'A.A.S.

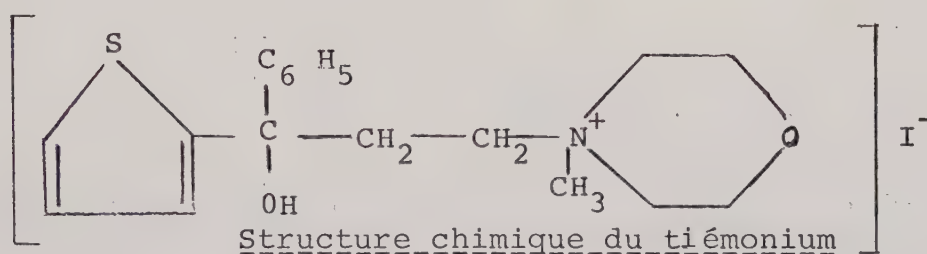
La dose thérapeutique est de 0,50 g par prise, et de 1 à 2 g par jour.

La concentration sanguine rapportée à une prise est de 100 µg/ml, et celle rapportée à la prise journalière est de 200 µg/ml.

Dans le test du chimiotactisme, une seule dose est utilisée : 1.000 µg/ml.

- Tiemonium :

C'est l'iodure de 4 - [3 - Hydroxy - 3 - phenyl - 3 - (2 - thienyl) propyl] 4 methyl morpholinium.



Le tiemonium est commercialisé sous le nom de "viscéral-gine" (forme injectable).

C'est un antalgique non antiinflammatoire.

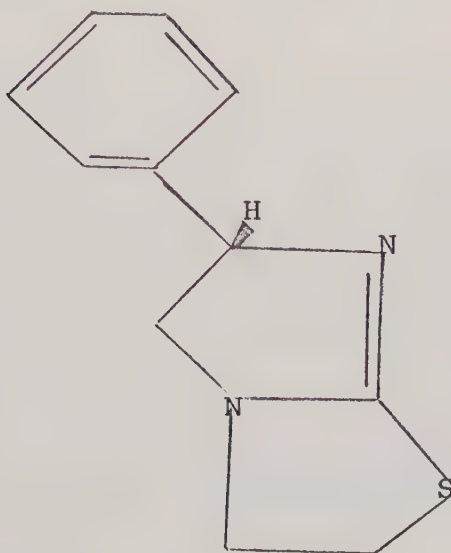
La dose thérapeutique est de 5 mg par prise, et de 15 mg par jour. La concentration sanguine rapportée à une prise est de 1 µg/ml et celle rapportée à la prise journalière est de 3 µg/ml.

Dans le test du chimiotactisme, une seule dose est utilisée : 1 µg/ml.

Le choix du tiemonium comme antalgique non antiinflammatoire est guidé par sa solubilité et par sa non toxicité. En effet, dans une étude préalable, il s'est révélé que certains médicaments ne pouvaient être testés, soit à cause de leur insolubilité, tel que la Glafénine, soit à cause de leur toxicité, tels que le Pentazocine, le Nozinan.

- Le lévamisole :

Nous avons utilisé le lévamisole comme un immunostimulant non spécifique. Son nom chimique est le 2, 3, 5, 6 -tétra hydro- 6 phénylimidazo (2, 1 - b) thiazole.



Structure chimique du lévamisole (L. tétramisole)

Il est commercialisé sous le nom de "SOLASKIL" (forme comprimés) et il est classiquement utilisé comme anthelminthique.

Nous avons utilisé le produit pur, fourni par les laboratoires Spécia, sous forme de chlorhydrate de lévamisole.

La dose thérapeutique est de 150 mg par prise et par jour.

La concentration sanguine rapportée à une prise est de 30 µg/ ml.

Dans le test de la migration spontanée en tube capillaire les doses utilisées sont :

30 - 90 - 300 - 600 µg/ml

Dans le test du chimiotactisme, deux doses sont utilisées :

30 - 150 µg/ml.

1.2. METHODES -

1.2.1. MIGRATION EN TUBE CAPILLAIRE -

- Principe :

La technique utilisée dérive de celle de SOBORG et BENDIXEN (18). Elle consiste à déterminer la surface de migration, hors d'un tube capillaire, de leucocytes humains dans un milieu nutritif en présence ou en absence de la substance à étudier.

Les résultats sont exprimés par un index de migration selon la formule :

$$I.M. = \frac{\text{surface de migration à étudier}}{\text{surface de migration témoin}}$$

- Matériels et réactifs :

. Matériels

- flacon de 60 ml pour le prélèvement de sang
- tubes capillaires : micro-hématocrites
- boîtes de pétri plastique Ø 35 mm type "falcon" pour culture cellulaire
- étuve spéciale à contrôle automatique de température et d'humidité
- cellules de thoma, de Bürker pour numération des cellules
- dispositifs de filtration à membrane millipore (Ø des pores 0,45 µ)
- agrandisseurs lumineux (microlecteur optico)
- film de rhodoïd
- balance de précision.

. Réactifs

- solution d'héparine : nous avons utilisé le soluté d'héparine Choay , dosé à 5000 UI/ml, dont on a réalisé une dilution au $\frac{1}{25}$ dans le sérum physiologique, stérile, de manière à avoir une concentration de 200 UI/ml dans le flacon de prélèvement.

- solution de Hanks de l'Institut Pasteur : c'est une solution saline isotonique, glucosée, tamponnée à pH neutre, après dilution dans de l'eau distillée. Cette solution est stérilisée par filtration sur membrane millipore. Elle sert pour le lavage des cellules.

- milieu 199 de l'Institut Pasteur : c'est un milieu complexe qui tient compte de tous les besoins cellulaires : glucides, lipides, sels minéraux, acides aminés indispensables, des facteurs de croissance, des vitamines, des bases puriques, etc... Il sert pour maintenir les cellules en culture. Ce milieu est dilué dans de l'eau distillée, puis enrichi par addition de 10 % (V/V) de sérum de poulain. Après vérification du pH, et stérilisation, il est réparti dans des flacons stériles en verre coloré. Il se conserve de trois semaines à un mois à la glacière.

- liquide de Turk :
 C'est un mélange :
 - . acide acétique 0,5 ml
 - . violet de gentiane 1 ml
 - . eau distillée q.s.p. 100 ml
 Il est utilisé pour numérer les leucocytes.

- solution de Bleu trypan :

C'est une solution mère de bleu trypan à 2 % qu'on dilue extemporanément au demi dans du sérum physiologique.

Cette solution sert pour tester la viabilité des cellules.

- Médicaments utilisés :

. le Kétoprofène

Nous avons utilisé les doses suivantes :

20 - 50 - 100 - 200 - 500 $\mu\text{g/ml}$

. le Lévamisol

Quatre doses sont testées :

30 - 90 - 300 - 600 $\mu\text{g/ml}$

Chaque médicament est utilisé en solution aqueuse sous le plus petit volume nécessaire pour obtenir la dose voulue de façon à modifier le moins possible le milieu de survie.

- Mode opératoire :

Le sang périphérique du sujet à tester est recueilli dans un flacon hépariné (200 UI/ml) stérile. 20 à 30 ml suffisent pour le test.

On laisse sédimenter une heure à 37° dans une étuve saturée d'humidité.

Le surnageant est aspiré avec une seringue, ainsi que la partie supérieure du sédiment cellulaire.

La suspension cellulaire est répartie dans des tubes en plastique et centrifugée 10 minutes à 200 g.

On jette le surnageant et on lave le culot trois fois dans du Hanks stérile.

Le culot est repris dans du milieu 199 enrichi de 10 % de sérum de poulain.

On effectue la numération des cellules à l'aide du liquide de Turk ; puis on ajuste avec du milieu 199 enrichi, de manière à obtenir une suspension finale de 10^7 leucocytes/mm³.

On fait monter par capillarité la suspension cellulaire dans des tubes à microhématocrite jusqu'aux deux tiers du tube.

On scelle à la flamme l'extrémité libre, puis les tubes sont centrifugés 10 minutes à 1 800 t/mn.

On prépare les chambres de migration (boîtes de pétri en plastique de 35 x 10 mm Falcon), dans lesquelles on introduit la substance à étudier dissoute dans de l'eau distillée et sous un volume correspondant à la dose voulue, puis on complète à 1 ml avec du milieu 199.

Quatre boîtes sont préparées pour chacune des doses à étudier, en plus de quatre boîtes contenant le milieu 199 enrichi seul et qui servent de témoins.

Les tubes une fois centrifugés, sont sectionnés perpendiculairement à l'interface sédiment-surnageant.

Les portions de tubes contenant les cellules sont fixées dans les chambres de migration déjà préparées.

On referme les boîtes à l'aide des couvercles, et on les pose à l'étuve saturée d'humidité à 37° C pendant 24h.

On met les tubes au bain-marie à 37° pendant 10 mn.

A l'aide de la cellule de Bürker on compte le pourcentage de cellules lysées (colorées en bleu) pour les tubes témoins et essai.

On admet un pourcentage des cellules colorées compris entre 0 et 5 pour un témoin normal.

L'action du médicament dans le test de la migration en tube capillaire peut être étudiée selon deux méthodologies :

- une incubation de 2 heures à 37° des cellules en présence de médicaments, suivie de 2 lavages, puis de la mise en place du test proprement dit.
- ou bien le médicament est directement placé dans la chambre de migration.

Une étude préalable à ce travail nous a montré que les résultats obtenus par ces deux techniques sont superposables ; nous avons donc choisi la seconde qui raccourcit le temps de manipulation déjà très long.

1.2.2. CHIMIOTACTISME -

- Principe :

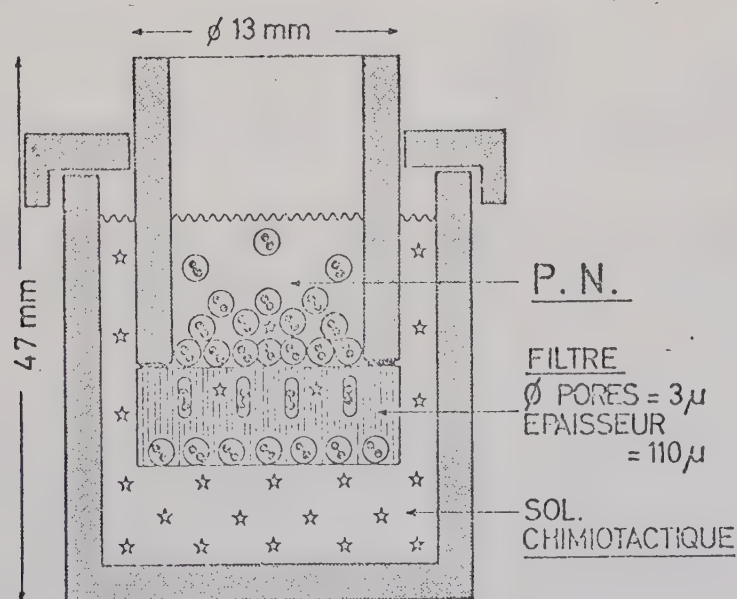
Nous avons choisi la technique de FREI (63) adaptée à celle de CORNELY (43).

On dispose de chambres à deux compartiments séparés par un filtre millipore dont le diamètre des pores est connu (3μ).

Dans le compartiment supérieur on met une suspension de polynucléaires (à une concentration connue : deux millions PN/ml) dont on veut tester l'activité chimiotactique.

Dans le compartiment inférieur, on met du plasma frais, activé ou non par un cytotaxigène (Gamma globulines agrégées).

Après un certain temps d'incubation, on compte le nombre de cellules qui ont traversé le filtre.



Chambre de migration à deux compartiments (165)

- Matériels et réactifs :

. Matériels

- des chambres stériles à 2 compartiments.
- filtres millipores n° 1 SSW PO 1.300. Le diamètre du filtre est de 13 mm, et celui des pores est de 3 μ .
- colle MF CEMENT n° XX 70.000.00
- pince millipore
- un dispositif de filtration sous vide stérile (millipore 0,25 μ).
- des grands béchers.
- des gros tubes à centrifugation stériles
- centrifugeuse 6.000 t/min. à contrôle de température intérieure.
- des erlenmeyers stériles.
- bain-marie à 37°.
- étuve spéciale à contrôle automatique de température et d'humidité.
- des ballons jaugés de 1.000 ml.
- des éprouvettes graduées.
- un agitateur magnétique.
- cellules Thoma (numération de pN).
- des bacs en plastique, des verres de montre.
- des supports en pyrex à fond parfaitement plat.

Tout le matériel doit être stérile et les différentes opérations doivent être réalisées le plus stérilement possible.

. Réactifs

- Dextran 250 en poudre
 - solution saline tamponnée aux phosphates (selon PHELPS)
 - l'ampoule de 1.000.000 UI de pénicilline G en poudre
 - une solution de streptomycine à 0,25 g par ml stérile
 - solution de Gamma globulines standard du Centre de Transfusion sanguine de Lyon. Lot n° 70 4.04.4.
 - albumine humaine réactif du Centre national de transfusion sanguine de Paris en poudre
 - hématoxyline de Weiger (pour coloration des PN)
 - liquide de Turk (pour numération des PN)
 - solution mère de bleu trypan à deux pour cent
 - sérum physiologique stérile
 - eau distillée stérile
 - alcool à 70°C, 95°C absolu
 - ampoule d'héparine Choay de 5 ml dosée à 5.000 UI/ml
- Mode opératoire :

. Préparation des solutions utilisées

(à effectuer avant le jour du test)

* préparation de la solution de Dextran 250 à 6 %

On met 6g de Dextran 250 en poudre dans un erlenmeyer propre et on ajoute 100 ml de solution physiologique de NaCl à 9‰.

On place sur un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète (30 à 40 min.) puis on filtre la solution stérilement et on la récolte dans un erlenmeyer stérile.

On conserve la solution à 4°C.

* préparation de la solution de pénicilline - streptomycine (50 ml)

C'est une solution concentrée d'antibiotiques que l'on ajoute aux différentes solutions acides et basiques afin d'éviter la contamination .. La concentration finale

d'antibiotiques : 20.000 UI de pénicilline, 5 mg de pénicilline et 5 mg de streptomycine par millilitre de solution.

On dissout la pénicilline avec 5 ml d'eau distillée stérile que l'on mettra dans le flacon stérile, puis on ajoute 1 ml de solution de streptomycine à 0,25 g par ml (préparée en dissolvant 1 g de streptomycine dans 4 ml), puis on complète avec 44 ml d'eau distillée stérile. Conserver la solution à 4°C.

* préparation de la solution tampon selon PHELPS

C'est une solution saline tamponnée aux phosphates, préparée à partir de deux solutions de base :

- une solution acide (jaune)
- une solution basique (rouge)

que l'on mélange ensuite de façon proportionnelle, afin d'obtenir un pH déterminé.

Préparation d'un litre de solution (acide ou basique).

FRACTION I	Solution acide	Solution basique
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.120 mg	0,3142 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	6,4406 mg

FRACTION II	Solution acide	Solution basique
Na Cl	8.000 mg	8.000 mg
KCl	400 mg	400 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg	100 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg	100 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	165 mg	165 mg
Glucose	1.000 mg	1.000 mg
Rouge de phénol	5 mg	5 mg

- On dissout la fraction I dans 400 ml d'eau distillée, puis on verse cette solution dans un erlen de 1 litre ; et on ajuste à 780 ml.
- On dissout la fraction II dans 200 ml d'eau distillée, on place le récipient sur un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète.
- On fait passer la fraction II dans l'erlen contenant la fraction I à un très faible débit (pour éviter la formation de précipités irréversibles).
- On ajoute 10 ml de solution de pénicilline, streptomycine et on complète à 1.000 ml avec de l'eau distillée.
- Pour obtenir une solution tampon à un pH déterminé, on mélange les solutions acide et basique dans des proportions variables, suivant le pH désiré pour 100 ml de solution :

Solution acide	14%	13,5%	12%	11%	10%
(à mettre d'abord)					
Solution basique	86%	86,5%	88%	89%	90%
pH	7,02	7,0	7,07	7,1	7,12

Le pH du mélange doit être compris entre 7,08 et 7,10.

On le corrige avec le pH-mètre en ajoutant un peu de solution acide ou basique.

+ 0,5 ml de solution acide baisse le pH d'environ 0,025.

+ 5 ml de solution basique hausse le pH d'environ 0,025.

* préparation de la solution de PHELPS avec HSA (albumine humaine)

Cette préparation constitue pour les polynucléaires un milieu inerte du point de vue chimiotactique, en rétablissant des conditions qui se rapprochent le mieux possible de celles du vivant (pH, pression oncotique, électrolytes). Elle servira donc à y mettre les polynucléaires en suspension.

On prépare 100 ml de solution : dans un flacon stérile.

- solution tampon basique : 80 ml
- solution HSA à 20 % : 10 ml
- solution tampon acide : 6,5 ml

Le pH de la solution finale doit être compris entre 7,15 et 7,17. On corrige le pH avec de la soude N.

* Solution de Gamma globulines agrégées (G.G.A.)

On utilise dans ce test les GGA comme cytotaxigènes car elles agissent sur le sérum de la même manière que les complexes Ag - Ac en activant les procytotaxines liées au complément. Elles permettent ainsi de stimuler la migration des polynucléaires à travers le filtre et d'étudier dans des conditions standard leur capacité de répondre à une stimulation qui reste toujours la même.

On met stérilement dans un tube 1 ml de solution de gamma globulines dosée (à 16,5 g %) et 9 ml de solution tampon PHELPS.

On obtient une concentration finale de 16 mg de GGA par millilitre.

On pose le tube au bain-marie à 63° pendant une heure.

On laisse reposer à 4°C au moins une semaine avant l'emploi.

* Formule de l'hématoxyline de Weigert

- . Solution A : Hématoxyline 1 g
Alcool 95° 100 ml
- . Solution B : Chlorure ferrique à 50 %.... 4 ml
Acide chlorhydrique à 25 %.. 1 ml
Eau distillée.....95 ml

* Liquide_de_turk

- acide acétique 0,5 ml
- violet de gentiane 1 ml (solution mère)
- eau distillée q.s.p. 1000 ml

* Solution_de_Bleu_trypan

Solution mère de bleu trypan à deux pour cent qu'on dilue au 1/2 avec du sérum physiologique au moment de l'emploi.

* Préparation_de_l'héparine

Nous avons utilisé l'héparine Choay à partir du soluté injectable de commerce en ampoule dosé à 5.000 unités internationales d'héparine par ml.

Nous avons réalisé une dilution au $\frac{1}{25}$ dans le sérum physiologique stérile, et nous l'avons répartie dans des flacons à prélèvement pour la concentration de l'anticoagulant dans le sang, soit de 20 UI/ml.

* Médicaments_testés

- Kétropofène

Nous avons utilisé la dose de 50 µg/ml

- Acide acétyl salicylique

La dose utilisée est de 1.000 µg/ml

- Tiemonium :

La dose utilisée est de 1 µg/ml

- Lévamisole :

Les doses utilisées sont :

. 30 µg/ml

.150 µg/ml

Chaque médicament est utilisé en solution aqueuse sous le plus petit volume nécessaire pour obtenir la dose voulue de façon à modifier le moins possible le milieu de survie.

. Préparation de la suspension de cellules.

Le test se pratique sur 10 à 15 ml de sang veineux prélevé au pli du coude, le matin à jeûn, dans un flacon stérile contenant 2 ml d'héparine à 200 UI/ml.

- Au volume de sang hépariné, on ajoute un demi-volume de Dextran à 6 % en soluté isotonique de NaCl.
On mélange en renversant 6 à 8 fois le tube.
- On met à sédimenter le flacon incliné pendant 15 mn et verticalement pendant 45 minutes à la température ambiante.
- On prélève délicatement le surnageant de la sédimentation et on le dépose dans un tube de 20 ml stérile.
- On centrifuge à 350 "g" (1.300 t/min) pendant 15 mn à la température ambiante.
- On prélève le surnageant de plasma-dextran, on le dépose dans un tube stérile de 20 ml.
- On resuspend le culot de cellules avec 5 ml de PHELPS + HSA.
- On centrifuge le plasma dextran à grande vitesse (3.000 t/min.) pendant 10 mn (pour éliminer les plaquettes et autres particules encore en suspension).
- On prélève un échantillon de la suspension de cellules pour compter les PN sur une cellule de thoma, après coloration au Turk (dilution au 1/10).
- On calcule le volume de solution de PHELPS + HSA à rajouter à la suspension de cellules pour obtenir une concentration finale de 2 millions PN/ml*.
- On met la solution de PN à + 4°.

* PN = polynucléaire.

. Vérification de la "viabilité cellulaire"

Elle a pour but de s'assurer que les PN n'ont pas subi de dommages au cours des manipulations effectuées, et que les médicaments utilisés ne sont pas toxiques (voir page 91).

Pour toutes les doses de produits testés, la viabilité est bonne (le pourcentage de cellules colorées n'excède pas 6 %).

. Les solutions "tests"

On prépare 12 tubes stériles de 6 ml numérotés de 1 à 12.

- On met dans chacun de ces tubes 1,2 ml de solution tampon (PHELPS).
- On ajoute dans les tubes n° 4, 5, 6, 10, 11, 12 : 0,05 de GGA.
- Dans les tubes 1 à 12, on ajoute 0,3 ml de plasma dextran de témoin (centrifugé à grande vitesse pendant 10 mn).
- On place les tubes au bain-marie à 37°C pendant 30 mn.

Chaque test est effectué en triple, c'est à dire que chaque variante comporte 3 chambres remplies traitées de façon identique.

. Remplissage des chambres de migration

- On met 12 chambres sur un support, numérotées de 1 à 12 sur le tube intérieur (en plexiglass).
- On remplit le compartiment inférieur en versant le contenu des 12 tubes placés au bain-marie.
Les filtres auront été collés pendant la préparation de la suspension de cellules.
- On abaisse alors le tube intérieur de chaque chambre, jusqu'à ce que le filtre affleure le liquide (le filtre doit alors s'humecter partiellement et lentement, mais le liquide de la partie inférieure ne doit en aucun cas, passer dans le compartiment supérieur).

- On met rapidement 0,5 ml de la suspension de cellules dans les compartiments supérieurs des chambres 1, 2, 3, 7, 8, 9 et 0,5 ml de la suspension de cellules additionnée de médicament dans les compartiments supérieures des chambres 4, 5, 6, 10, 11, 12.
- On abaisse encore un petit peu le tube intérieur pour ajuster les deux niveaux extérieur et inférieur, à la même hauteur (équilibre des pressions hydrostatiques).
Finalement on met les chambres sur un plateau et on les pose à l'étuve à 37°C en atmosphère humide. On laisse incuber pendant 2h 30.

. Coloration des filtres.

- On couvre la table avec un papier de protection et on sort les chambres de l'étuve.
- On découpe les filtres à l'aide d'une lame à rasoir, on les rince avec du sérum physiologique, puis avec de l'alcool absolu.
- On dispose les filtres dans 12 bacs contenant de l'alcool absolu, pendant 1/4 d'heure exactement : c'est la fixation.
La face inférieure des filtres doit être tournée vers le haut.
- On prépare :
 - . 2 verres de montre avec, dans chacun d'eux, 1 ml de weigert I et 1 ml de weigert II (colorant).
 - . 12 bacs d'eau distillée pour le rinçage.
 - . 4 bacs avec de l'alcool à 70°
 - . 4 bacs avec de l'alcool à 95°
 - . 4 bacs avec de l'alcool absolu
 - . 12 coupelles pour le xylol.

Après la fixation, on rince les filtres avec de l'eau distillée, et on les colore en les laissant 2 mn dans le colorant de weigert, on les rince dans de l'eau distillée, puis on les déshydrate un à un par passage de 9 mn dans chacun des bacs d'alcool en concentration montante.

- On les dépose dans les coupelles de xylol correspondantes.
- On laisse les filtres 30 mn dans le xylol et pendant ce temps, on prépare 12 lames de microscopes numérotées.
- Sur chaque lame, on met 2 gouttes de baume de Canada, on dépose le filtre correspondant, toujours face "inférieure" tournée vers le haut, on couvre le filtre avec un peu de baume de Canada et on met en place la lamelle couvre-objet.
- On laisse les lames sécher pendant 3 jours avant de faire la lecture.
- On centrifuge les cuves 10 mn à 2.000 t/mn.

. Lecture

* Lecture des cuves

C'est une lecture immédiate.

- Après centrifugation des cuves, on compte au microscope à contraste de phase le nombre de polynucléaires qui ont traversé entièrement le filtre et sont tombés sur le fond des cuves.
- On compte 5 champs et on fait la moyenne par champ pour chaque cuve.
- Pour chaque chambre, le résultat global correspond à la somme des PN comptés sur le filtre et sur le fond de la cuve.

* Lecture des filtres

- Une fois tous les filtres fixés entre lame et lamelle, on vérifie qu'ils soient bien tous tournés dans le bon sens (face "inférieure" tournée vers le haut).

- Au microscope, on différencie facilement les deux faces, la supérieure étant recouverte d'un sédiment de globules rouges et de grosses cellules n'ayant pas migré, la face inférieure au contraire est très propre, avec seulement les PN ayant migré.
- La mesure des résultats, qui peut se faire les jours suivants, consiste simplement à compter le nombre moyen de PN sur la couche tout à fait "inférieure" du filtre (la première qui devient nette en baissant l'objectif).
- Le comptage est effectué à l'intérieur d'un "réticule" disposé sur l'oculaire et correspondant à une surface de 0,1 mm² avec l'objectif 40.
- On compte 5 champs différents du filtre choisis au hasard, pour chaque chambre, le résultat est exprimé en nombre moyen de cellules / champ du filtre.

1.2.3. ETUDE STATISTIQUE -

Nous avons interprété nos résultats statistiquement.

Les méthodes utilisées sont :

- soit classiques, notamment l'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés (183) (242), et la Méthode des couples.
- soit des méthodes non paramétriques :

Ces méthodes actuellement très utilisées pour l'interprétation des résultats en biologie, tiennent compte plus des relations d'ordre entre les mesures réalisées que de leur variabilité (192).

. Test des signes

Ce test permet de composer les différences entre deux séries de mesures appariées.

On se fixe l'hypothèse H_0 : la moyenne des différences des deux mesures est nulle.

Contre l'hypothèse H_1 : une des mesures réalisées est systématiquement $\geq$ à l'autre.

On étudie la distribution des signes des différences entre les couples de mesures.

On considère : t = nombre total de couples

N = nombre de signes qui s'accordent avec l'hypothèse H_1

$$x = t - N$$

Il existe des tables qui, pour une valeur de N , donnent les probabilités d'obtenir différentes valeurs de x .

Lorsque p correspondant est supérieur à la valeur seuil que l'on se fixe, on est conduit à rejeter l'hypothèse H_0 .

. Analyse non paramétrique de variance de Friedman.

C'est une analyse de variance qui s'appuie sur les rangs de mesures, lorsqu'on dispose de plusieurs échantillons.

Les données sont rangées dans un tableau à N lignes et K colonnes.

Les lignes représentent les variations de facteurs expérimentaux.

Les colonnes représentent les variations d'individus.

A chaque valeur d'une ligne on affecte le numéro de son classement. On se fixe l'hypothèse H_0 : le K échantillon provient d'une même population.

Le test de Friedman permet de déterminer la valeur χ^2 pour un degré de liberté = $K-1$.

$$\chi^2 = \frac{12}{NK (K + 1)} \left\{ \sum (R_j)^2 - 3 N (K + 1) \right\}$$

R_j = somme de rangs dans j ème colonnes

N = nombre de lignes

K = nombre de colonnes.

2. RÉSULTATS

- 2.1. ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE
EN FONCTION DU TEMPS -
 - 2.2. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA MIGRATION
SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE EN FONCTION DU TEMPS -
 - 2.3. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LA MIGRATION
SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE.-
 - 2.4. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN FONCTION DU TEMPS -
 - 2.5. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN PRESENCE DE SUBSTANCES
CYTOTAXIGENES -
 - 2.6. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LE CHIMIOTACTISME -
 - 2.7. ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACETYL-SALICYLIQUE SUR
LE CHIMIOTACTISME -
 - 2.8. ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM SUR LE CHIMIOTACTISME -
 - 2.9. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LE CHIMIOTACTISME -
-

2. RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.1. ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE EN FONCTION DU TEMPS

Dans le tableau (II) nous avons fait figurer l'ensemble des résultats que nous avons obtenus dans l'étude de la migration spontanée en tube capillaire en fonction du temps.

Cette étude est faite chez neuf sujets sains (4 hommes et 5 femmes). - (figure 13).

Elle porte sur une durée de 30 jours, et les prélèvements sont effectués à 15 jours d'intervalle.

Quatre migrations sont pratiquées pour chaque prélèvement.

Les chiffres figurant dans le tableau représentent le poids de la surface de migration agrandie 10 fois et projetée sur film rhodoïd, exprimé en mg.

ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE
EN FONCTION DU TEMPS

sujet ur	VEY.	M.A.	MIC.	CHA.	CAT.	JOC.	NAD.	BER.	BEC.
J1 yenne	172,6	146,3	121,4	76,4	57,2	101,3	69,5	274,3	77,6
	223,8	70,9	83,2	65,4	53,8	56	87,4	249,3	61,3
	177,7	40,1	135,5	132,8	51,5	103,1	112,8	175,6	69,3
	157,5	79,1	173,2	28,4	35,3	99	54,1	195,3	60,7
	182,9	84,1	128,32	75,75	49,45	89,85	80,95	223,62	67,22
J2 yenne	250	360,3	250	106,6	167	133,6	375,2	314,7	218,7
	244,7	347,1	210	79,6	122,4	190,5	385,1	230	251,5
	235,8	383,4	170,1	55,7	48,4	107,7	332,8	380	348
	287,4	347,7	216,3	87	71,2	162,7	364,8	304	235,2
	254,47	359,62	211,60	82,22	102,25	148,62	364,47	307,17	263,35
J3 yenne	286,9	198,5	183,3	95,3	181,2	271,3	132,7	327,7	41
	398,5	215,1	215,8	145,1	149	197,7	152,9	112,7	61
	318,7	190	114,4	120,7	43,7	143,2	67,4	262,7	44
	280	143	113,3	147,4	108,8	280,8	277,5	355,7	49
	321	186,65	156,70	127	121,67	228,25	157,62	264,70	48,75

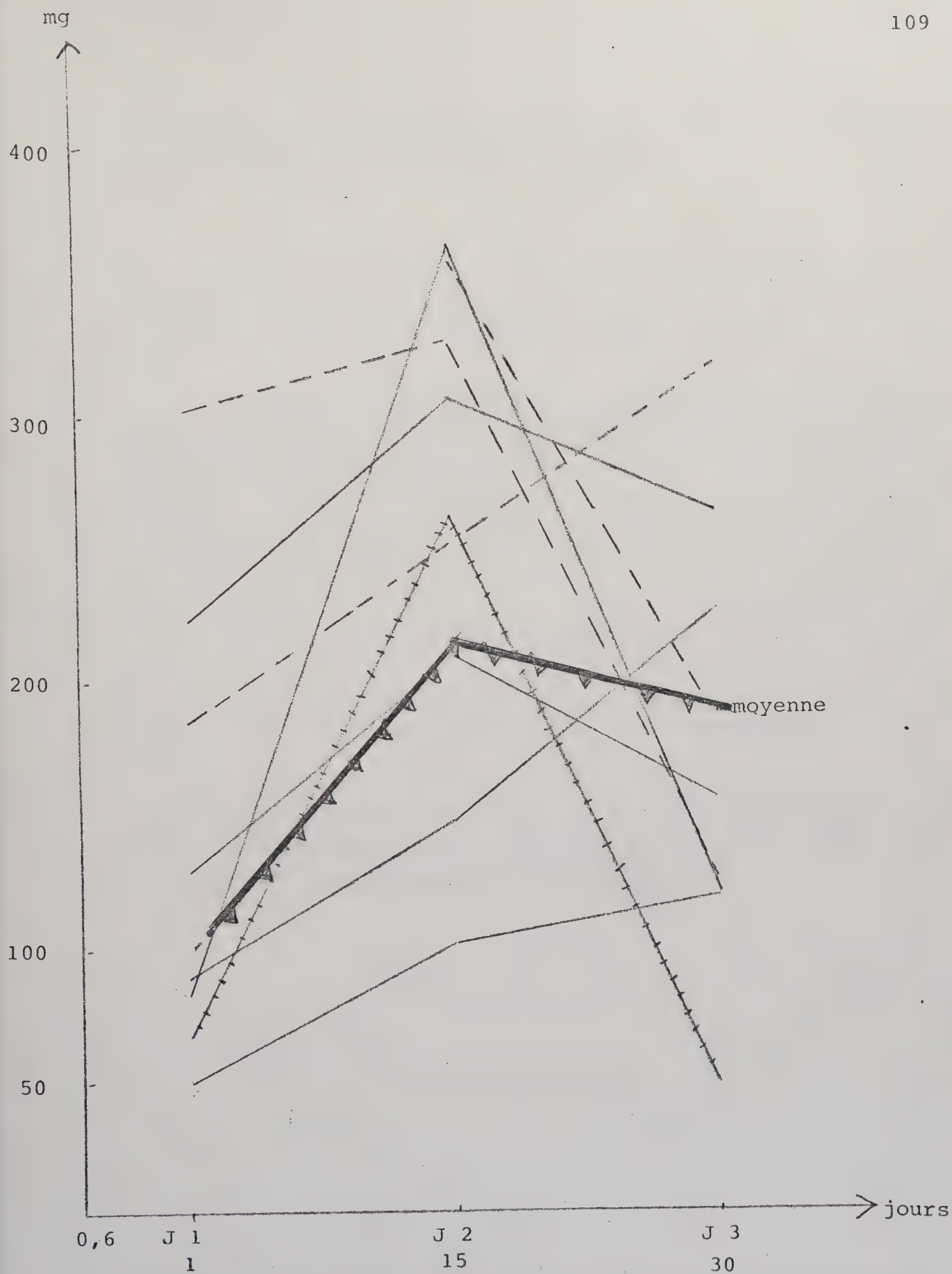


Figure 13 : ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE
EN FONCTION DU TEMPS.

2.2. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE EN FONCTION DU TEMPS

Dans le tableau (III), nous faisons figurer les résultats obtenus dans notre étude de l'action du Kétoprofène sur la migration spontanée en tube capillaire.

Cette étude est pratiquée chez huit sujets témoins sains (3 hommes et 5 femmes) et répétée deux fois à 30 jours d'intervalle (figures 14 et 15).

Cinq doses de Kétoprofène sont testées : 20, 50, 100, 200, 500 µg/ml.

Les résultats sont exprimés par l'index de migration :

$$IM = \frac{\text{migration en présence du Kétoprofène}}{\text{migration en absence du Kétoprofène}}$$

L'index de migration est établi d'après la moyenne de 4 migrations en présence de chaque dose de Kétoprofène et de 4 migrations en absence de Kétoprofène.

ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE
EN FONCTION DU TEMPS

$$I.M. = \frac{\text{migration en présence du Ketoprofène}}{\text{migration en absence du Ketoprofène}}$$

I.M. sujets Doses du Ketoprofène	VEY.		M.A.		CHA.		CAT.		JOC.		NAD.		MIC.		BER.		MOY.
	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2	
20 µg	1,03	0,93	0,96	0,79	1,82	1,24	0,99	0,96	0,98	0,86	0,90	0,63	0,63	1,11	0,99	0,74	0,97
50 µg	1,03	1,06	0,96	0,90	1,88	1,22	1,032	0,93	0,90	1,27	0,61	0,72	0,72	1,08	1,22	0,89	1,02
100 µg	1,10	0,75	0,95	0,80	1,17	1,28	1,22	1,21	0,90	0,71	1,23	0,51	0,70	0,93	0,95	0,85	0,95
200 µg	0,95	0,85	0,92	0,89	1,15	1,13	0,83	0,95	0,75	0,88	1,49	0,88	0,56	1,15	0,98	1,10	0,96
500 µg	0,80	0,78	0,85	0,80	0,90	0,98	0,80	0,95	0,76	0,89	0,98	0,69	1,21	0,95	0,86	0,92	0,88

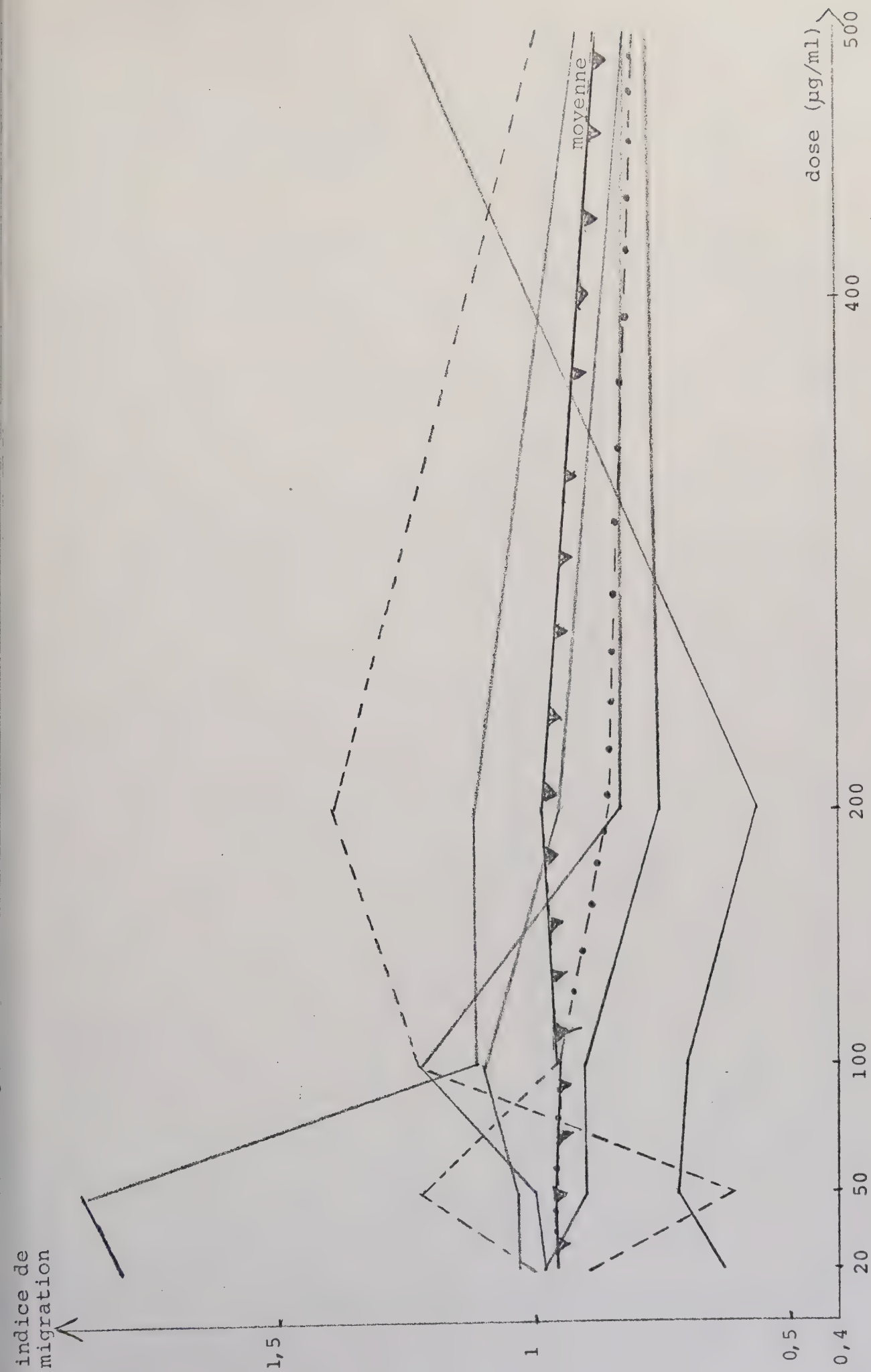


Figure 14 : ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE

SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE (J 1).

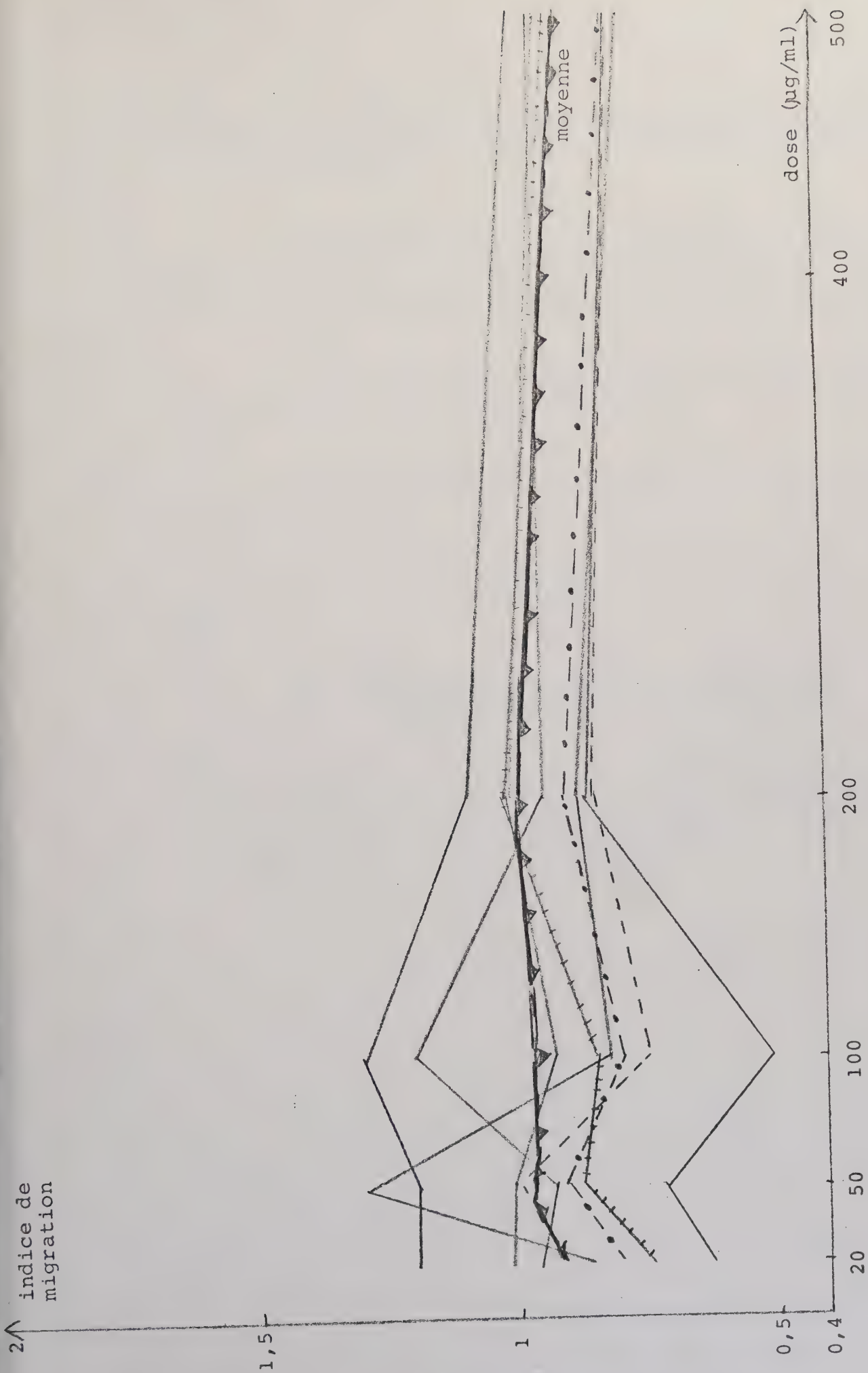


Figure 15 : ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE
 SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE (J 2) .

2.3. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE

Dans le tableau (IV) nous avons fait figurer les résultats obtenus, au cours de notre étude de l'action du lévamisole sur la migration spontanée en tube capillaire.

Cette étude est effectuée chez 10 sujets témoins sains (2 hommes et 8 femmes) (figure 16).

Les 4 doses de lévamisole sont : 30, 90, 300, 600 µg/ml.

Les résultats sont exprimés par l'index de migration :

$$IM = \frac{\text{migration en présence du lévamisole}}{\text{migration en absence du lévamisole}}$$

L'index de migration est établi d'après la moyenne de 4 migrations en présence de chaque dose de lévamisole et de 4 migrations en absence de lévamisole.

ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE

I.M. = $\frac{\text{migration en présence du lévamisole}}{\text{migration en absence du lévamisole}}$

Doses	<i>I.M. sujets</i>	CAT.	M.C.	MIC.	MAU.	YVE.	ANN.	M.A.	MIC.	HEL.	ADE.	MOY.
30 µg		1,31	1,12	1,44	0,86	1,02	0,74	0,98	1,43	0,75	1,12	1,07
90 µg		1,14	0,90	1,15	0,88	1,81	0,68	1,26	1,43	0,89	1,08	1,12
300 µg		1,26	0,62	1,32	0,95	0,93	0,36	1,56	1,06	0,96	1,17	1,01
600 µg		1,17	0,93	1,19	0,80	1,16	0,62	1,35	1,11	1,01	1,05	1,03

indice de
migration

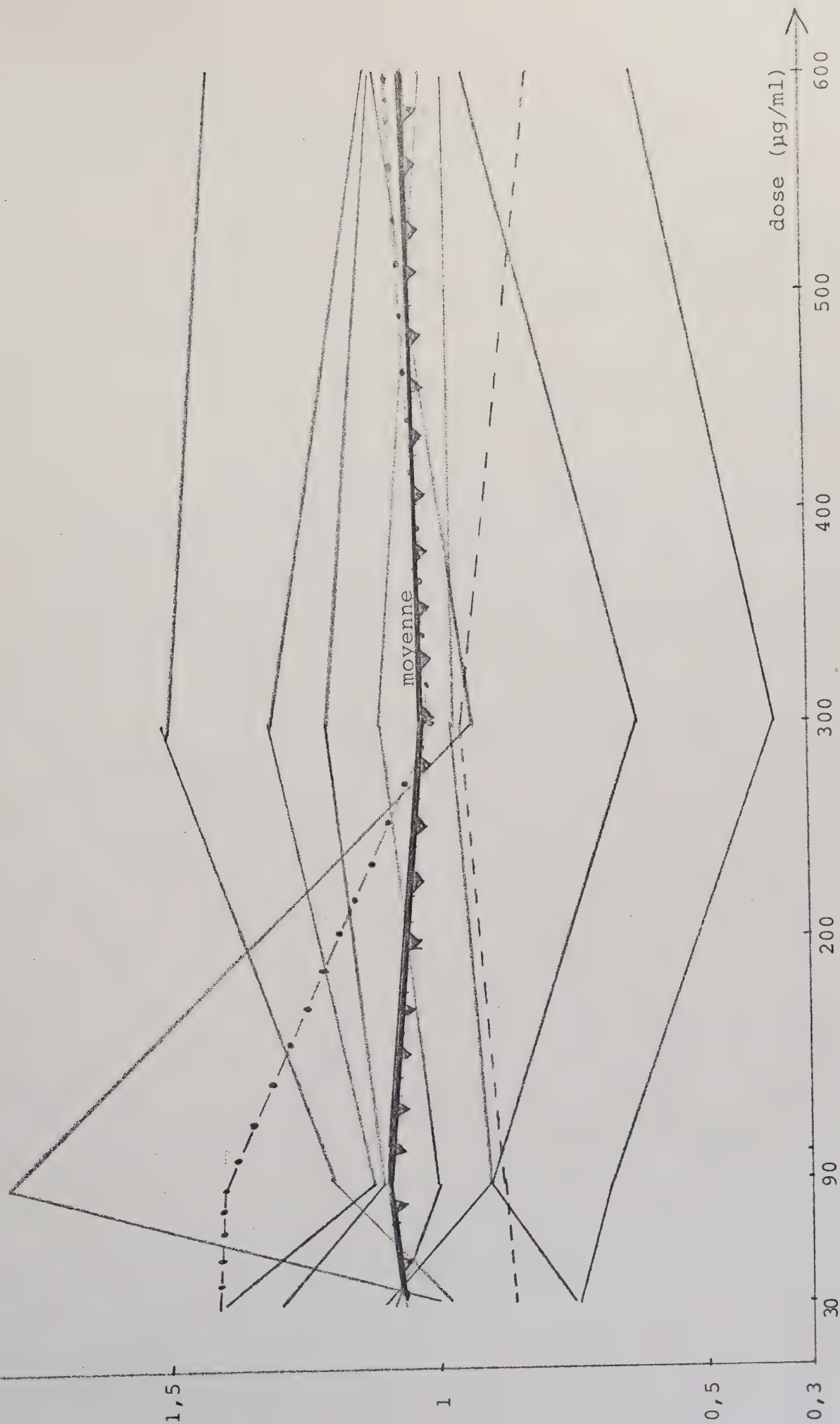


Figure 16 : ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE
SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE.

2.4. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN FONCTION DU TEMPS

Dans le tableau (V) figurent les résultats que nous avons obtenus deans l'étude du chimiotactisme effectuée chez 5 sujets témoins sains (2 hommes et 3 femmes) en fonction du temps.

Cette étude est pratiquée en présence des facteurs plasmatiques du sujet, mais sans stimulation exogène.

Les prélèvements sont effectués à 15 jours d'intervalle, (j1, j2, j3, j4) soit sur une durée de 45 jours.

Les résultats figurant dans ce tableau représentent la moyenne par champ du nombre de polynucléaires ayant migré (moyenne de 15 lectures).

Cette étude ne comporte l'adjonction d'aucun médicament.

/ TABLEAU V /

ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN FONCTION DU TEMPS

Nb. sujets pN par champ	M.A.	CHA.	CAT.	JOS.	BER.
J1	15	25	49	18	22
J2	27	16	6	7	35
J3	15	15	39	16	14
J4	15	15	13	13	14

2.5. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN PRESENCE DE SUBSTANCES CYTOTAXIGENES

Dans le tableau (VI) figurent les résultats obtenus dans l'étude du chimiotactisme en présence d'une substance cytotoxigène (16 mg de GGA par ml)*.

Cette étude est pratiquée chez 13 témoins sains (5 hommes et 8 femmes).

Les résultats figurant dans ce tableau représentent la moyenne par champ du nombre de polynucléaires ayant migré (moyenne de 15 lectures).

Cette étude ne comporte l'adjonction d'aucun médicament.

* GGA : gamma-globuline agrégée.

ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN PRESENCE DE SUBSTANCE CYTOTAXIGENE

Nb. <i> Sujets</i> PN/champ	VEY.	M.A.	CHA.	JOC.	BER.	LEC.	BEC.	CLA.	HEL.	MAU.	YOS.	ANN.	ADE.	moyenne
PN	10	30	18	12	23	37	14	18	20	23	11	10	42	20,6
PN + IgG	16	35	39	17	35	42	18	23	23	29	15	12	48	26,1

2.6. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LE CHIMIOTACTISME

Dans le tableau (VII) nous avons fait figurer les résultats obtenus dans l'étude de l'action du Kétoprofène sur le chimiotactisme.

Cette étude porte sur 9 sujets témoins sains (4 hommes et 5 femmes) (figure 17).

L'action du Kétoprofène (50 $\mu\text{g/ml}$) sur le chimiotactisme est étudiée en présence et absence de substance cytotoxigène.

Les résultats figurant dans ce tableau représentent la moyenne par champ, du nombre de polynucléaires ayant migré (moyenne de 15 lectures).

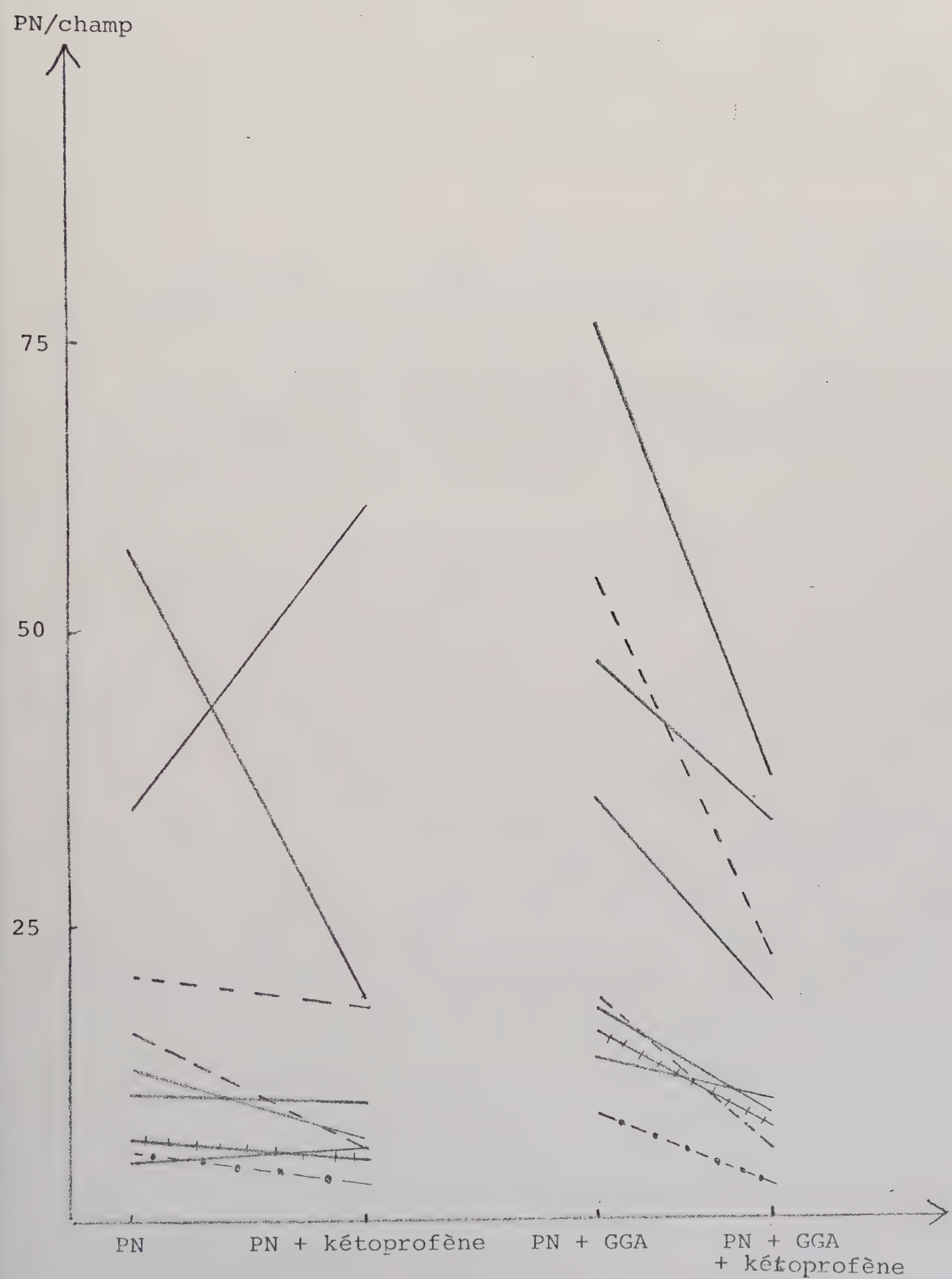
Nous avons effectué une double lecture : filtre et filtre plus fond de cuve.

ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LE CHIMIOTACTISME

Filtres	sujets										
	Nb. PN/champ	VEY.	HEL.	CHA.	CAT.	JOS.	NAD.	BER.	BEC.	MIC.	moyenne
	PN	5,6	13	16,1	6	7	57	35	11	21	19
	PN + 50µg	6	6,8	6,2	3	5	19	61	10	18	14,4
	PN + IgG	17,9	36	55,7	9	16	48	77	14	19	32,5
	PN + IgG + 50µg	8,8	19	23,7	3	8	34	38	10	6	16,72

Filtres + cuves											
	PN	17,6	62	26,1	7	7,5	89	50	51	80,1	43,3
	PN + 50 µg	7	8,8	6,55	3,35	11,8	32	75	10	18	17,9
	PN + IgG	24,9	80	56,7	10	18,4	79	81	14	19	42,4
	PN + IgG + 50µg	10,8	20	24,7	3,35	8	50	39	10	6	19

Figure 17 : ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE
SUR LE CHIMIOTACTISME DES POLYNUCLEAIRES.



2.7. ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACETYL SALICYLIQUE SUR LE CHIMIOTACTISME

Dans le tableau (VIII) figurent les résultats que nous avons obtenus dans l'étude de l'action de l'acide acétyl salicylique sur le chimiotactisme, chez 9 sujets témoins sains (4 hommes et 5 femmes) (figure 18).

L'action de l'aspirine (1.000 $\mu\text{g/ml}$) sur le chimiotactisme est étudiée en présence et en absence de substance cytotoxigène (gamma-globuline agrégée).

Les résultats figurant dans ce tableau représentent la moyenne par champ, du nombre de polynucléaires ayant migré (moyenne de 15 lectures).

Nous avons effectué une double lecture : filtre et filtre plus fond de cuve.

ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACETYL SALICYLIQUE SUR LE CHIMIOTACTISME

Nb. PN / champ	sujets									
	VEY.	M.A.	CHA.	CAT.	JOC.	BER.	NAD.	LEC.	BER.	moyenne
PN	16	15	25	49	18	22	15	37	18	23,88
PN + 1000 µg	23	12	36	25	14	47	21	19	23	24,44
PN + IgG	14	16	39	20	13	11	17	42	22	21,55
PN + IgG + 1000 µg	11	8	46	14	10	16	13	11	32	17,88

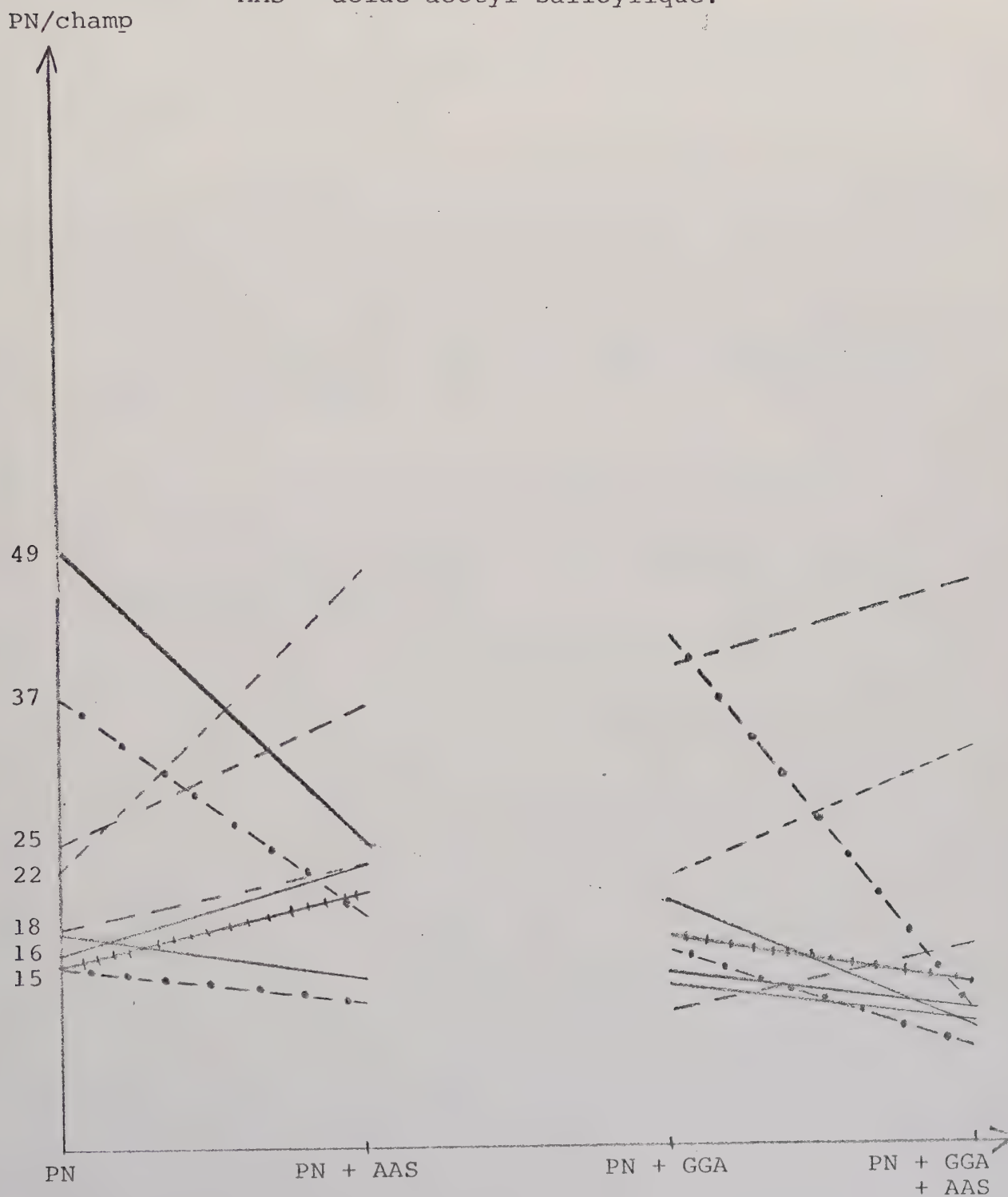
Filtres

Nb. PN / champ	sujets									
	VEY.	M.A.	CHA.	CAT.	JOC.	BER.	NAD.	LEC.	BER.	moyenne
PN	26,8	18,6	76	68,4	18,6	26	17	100	104,8	50,6
PN + 1000 µg	37,6	12,4	92	43	18	47,6	23,4	22,8	76	41,54
PN + IgG	18,2	13,2	111	20,6	16,8	12,6	22,4	22,4	76	57,2
PN + IgG + 1000 µg	14,4	8,4	22,2	15,4	12,4	16	14	16	106,4	31,6

Filtres
+
cuves

Figure 18 : ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACÉTYL-SALICYLIQUE
SUR LE CHIMIOTACTISME.

AAS = acide acétyl-salicylique.



2.8. ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM SUR LE CHIMIOTACTISME

Dans le tableau (IX), nous avons fait figurer les résultats obtenus au cours de l'étude de l'action du tiemonium sur le chimiotactisme.

Cette étude porte sur 10 témoins sains (3 hommes et 7 femmes).

L'action du tiemonium (1 μ g/ml) sur le chimiotactisme est étudiée en présence et en absence de substance cytotoxigène (gamma globuline agrégée).

Les résultats figurant dans ce tableau représentent la moyenne par champ, du nombre de polynucléaires ayant migré. (figure 19).

Il s'agit d'une moyenne de 15 lectures.

Une double lecture est effectuée : filtre et filtre plus fond de cuve.

ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM SUR LE CHIMIOTACTISME

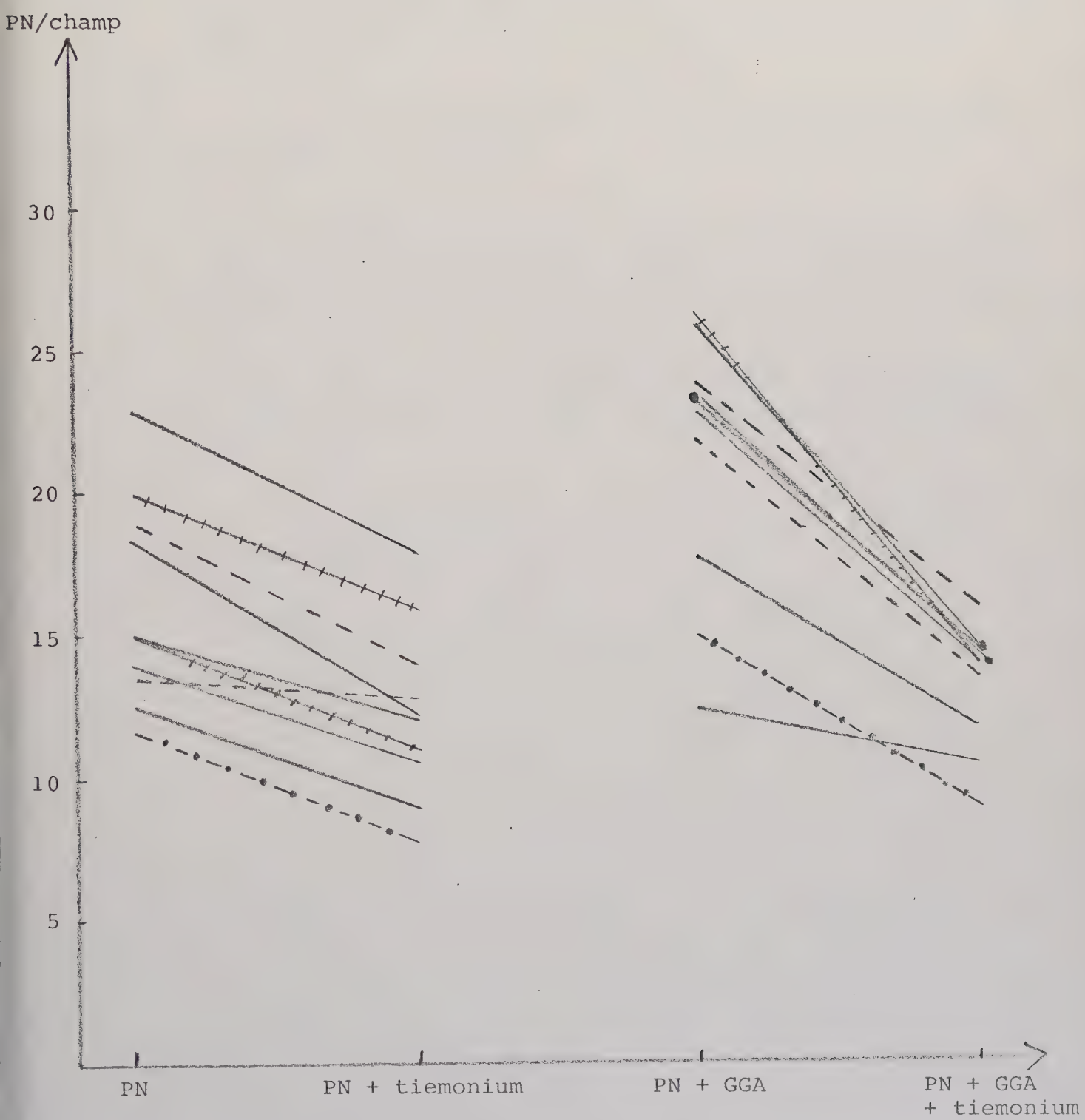
Nb. <i>su jets</i> PN / champ		M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	moyenne
PN		15	20	13,4	12,6	23	11,8	14	15,0	19	18,5	16
PN + 1 µg		12	16	12,8	9	18	7,2	10,6	11,1	14	12,2	12
PN + IgG		23	23	22	12,4	25	15	17,8	25,5	24	23,2	21
PN + IgG + 1 µg		14	14	13,6	10,5	14,6	9,13	11,8	14	16	14,4	13

PN		20	30	13,8	15,6	29,5	11,8	14,6	17,3	32	22	21
PN + 1 µg		12	29,5	13	9,4	19,3	7,2	11,66	11,1	14	12,2	14
PN + IgG		29	27	22,7	12,4	29	15	20,8	26,9	53,6	39,86	27
PN + IgG + 1 µg		14	14,3	16	10,7	14,9	9,1	12,3	14,0	16	14,4	13

Filtres

Filtres
+
cuves

Figure 19 : ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM
SUR LE CHIMIOTACTISME DES POLYNUCLEAIRES.



2.9. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LE CHIMIOTACTISME

Dans les tableaux (X) et XI) figurent les résultats obtenus dans l'étude de l'action du lévamisole sur le chimiotactisme.

Cette étude porte sur 10 sujets témoins sains (2 hommes et 8 femmes).

Nous avons étudié l'action de 2 doses de lévamisole : 30 et 150 $\mu\text{g/ml}$, en présence et en absence de substance cytotoxigène (gamma globuline agrégée) (figures 20, 21).

Les résultats figurant dans ces tableaux représentent la moyenne par champ, du nombre de polynucléaires ayant migré.

Une double lecture est effectuée : filtre et filtre plus fond de cuve.

ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE 30 µg/ml SUR LE CHIMIOTACTISME

Filtres		Nb PN / champ	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	moyenne
		PN	15	20	16	39,7	23	11,8	14	14,9	19	18,5	19,19
		PN + 30 µg	10	13	13	31	12,7	9,1	13	12,8	14	9,6	13,82
		PN + IgG	23	23	47	32	25,1	15	17,8	25,5	24	23,2	25,56
		PN + IgG + 30 µg	13	13	23	25	14	10,46	14	17,4	16	12,9	15,87
Filtres + cuves		PN	20	30	18	17,7	29,5	11,8	14,6	17,31	32	22	29,59
		PN + 30 µg	12	13,5	13,4	55	15,7	9,1	13,13	12,8	14	9,6	16,82
		PN + IgG	29	27	51	78	29,1	15	20,8	26,9	53,6	39,8	37,04
		PN + IgG + 30 µg	13,7	13	23,1	32	14,8	10,4	14,1	17,4	16	14,4	16,8

ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE 150 µg/ml SUR LE CHIMIOTACTISME

Filtres	sujets		M.C.	CAT.	ANN.	MAU.	YVE.	HEL.	M.A.	MIC.	ADE.	MIC.	moyenne
	Nb.	PN / champ											
	PN		23,8	38,5	10	27,2	37,4	27,4	27,4	72	42	7,4	32,8
	PN + 150 µg		32,2	25,1	12,2	39	64	8,6	7	13,4	12,8	5	22
	PN + IgG		22,4	53,5	12,8	35,2	99,8	30,8	19	25,6	48,2	6,8	35,4
	PN + IgG + 150 µg		22,2	22,3	15,6	25,1	102,7	8,9	10	11,2	11,4	6,8	23,6
Filtres + cuves	PN		68,8	205,8	15,8	39,2	218,8	123,6	68	111,2	100	8	121,4
	PN + 150 µg		49,2	57,2	14,2	69	103,4	9,4	7	14,8	19,6	5	72
	PN + IgG		29,2	166	14	61,4	157,4	52,6	83,4	62,6	104,8	6,8	61,8
	PN + IgG + 150 µg		29,8	42,4	17,6	34,2	202,8	10,4	10	11,2	16,4	6,8	38

Figure 20 : ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE (30 $\mu\text{g/ml}$)
SUR LE CHIMIOTACTISME DES POLYNUCLEAIRES.

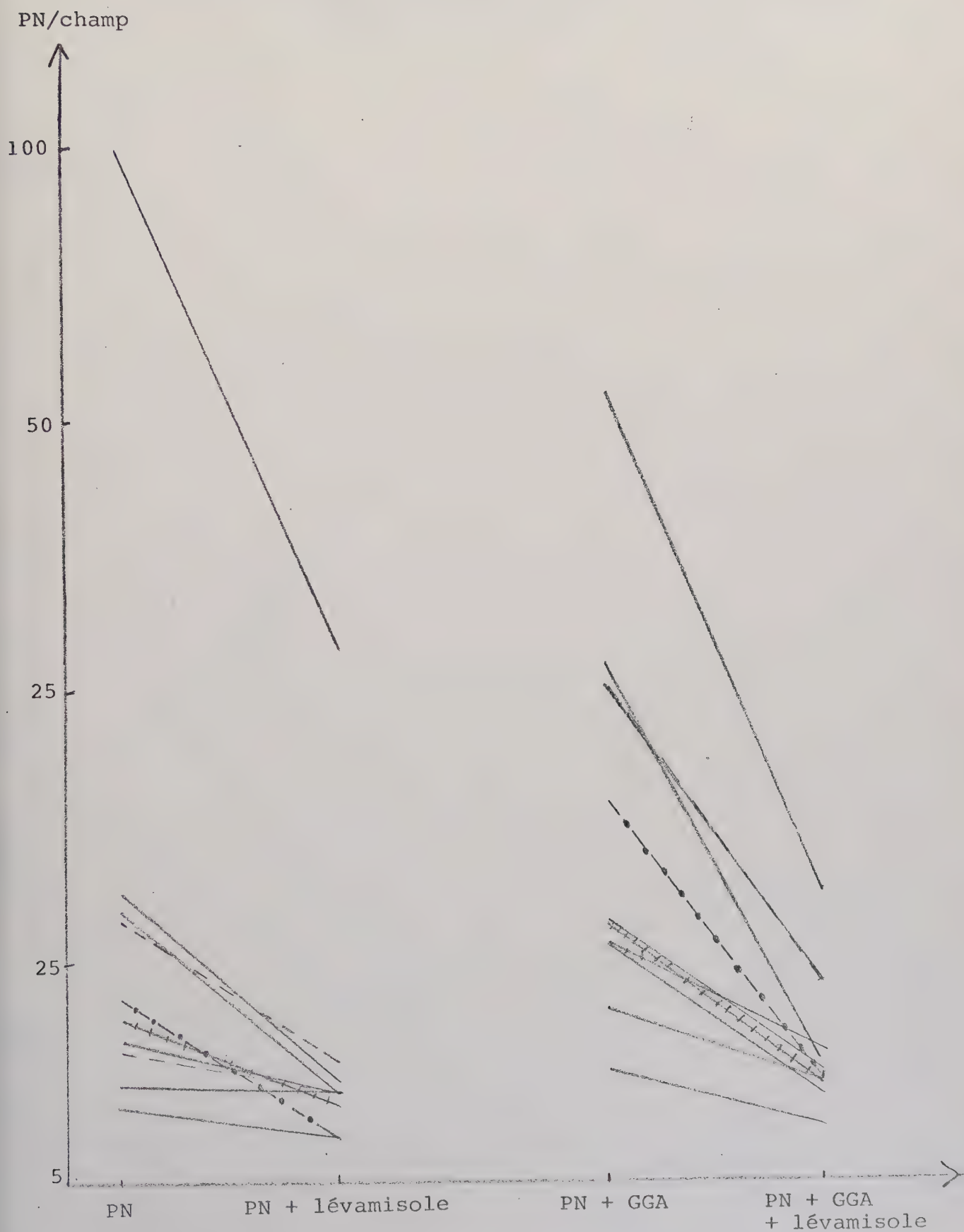


Figure 21 : ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE (150 $\mu\text{g/ml}$)
SUR LE CHIMIOTACTISME DES POLYNUCLEAIRES.

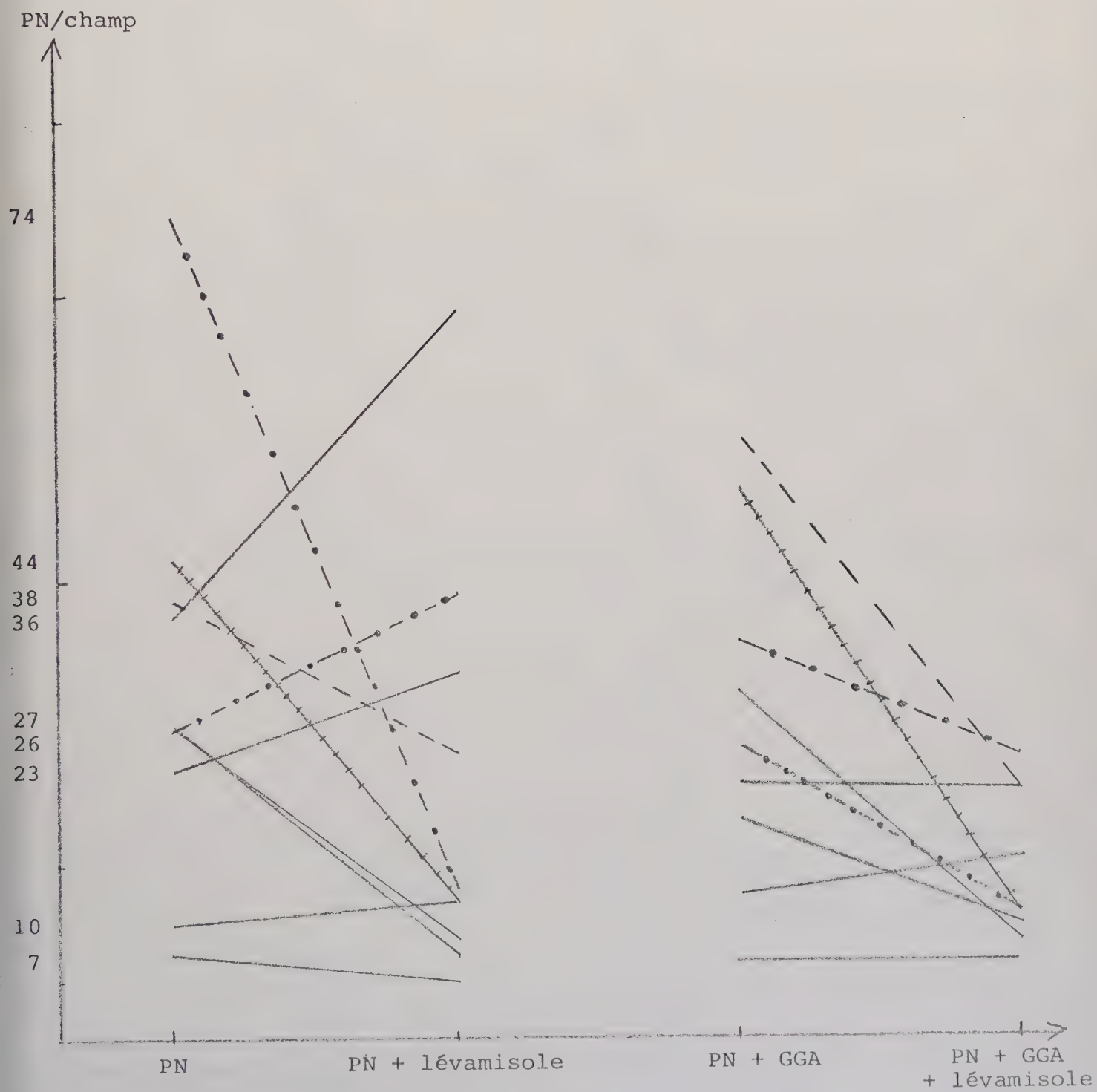
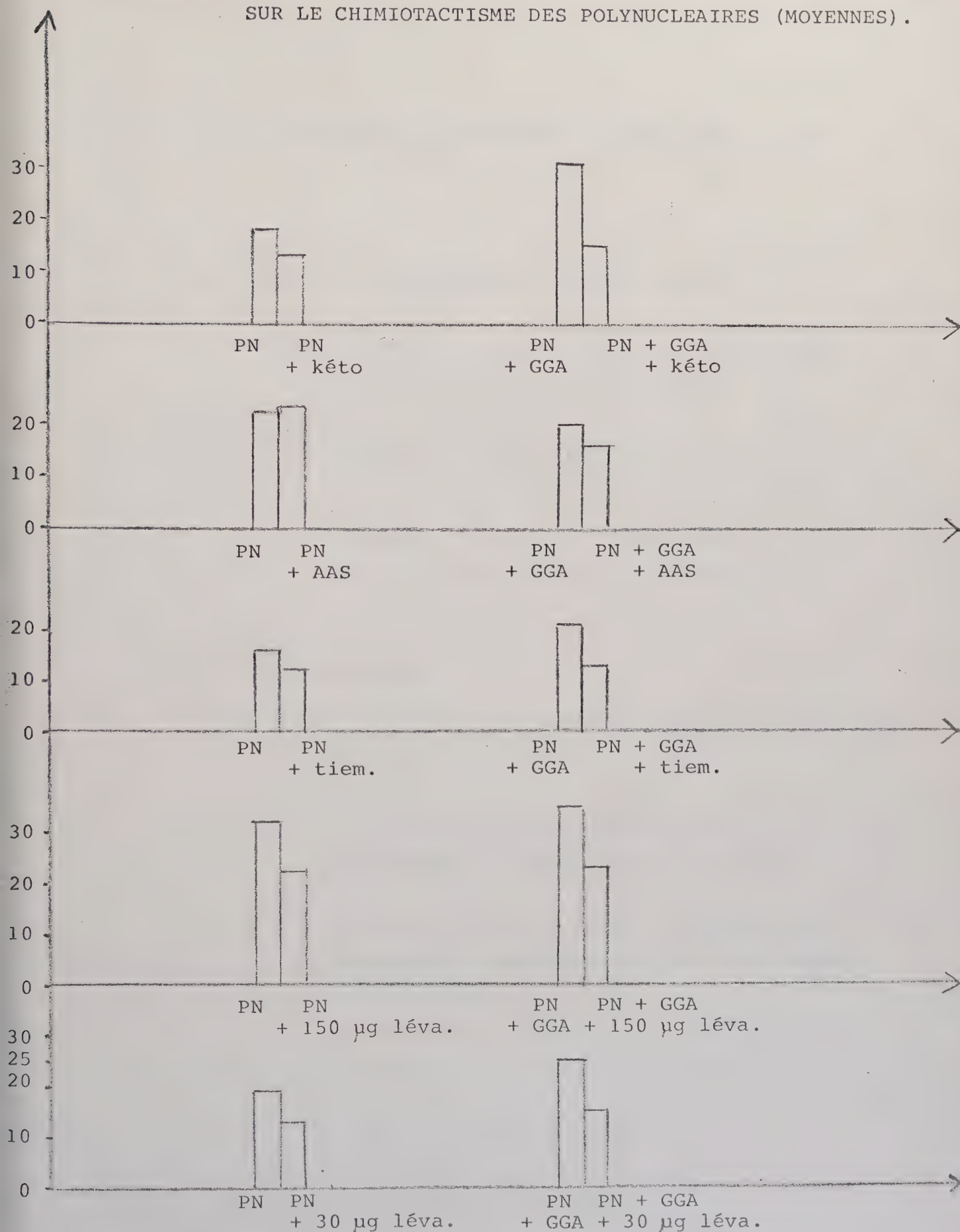


Figure 22 : ETUDE COMPAREE DE L'ACTION DE QUATRE MEDICAMENTS TESTES SUR LE CHIMIOTACTISME DES POLYNUCLEAIRES (MOYENNES).



3. ANALYSE DES RÉSULTATS ET ETUDE STATISTIQUE

3.1. MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE -

3.1.1. Etude de la migration spontanée en tube capillaire en fonction du temps.

3.1.2. Etude de l'action du kétoprofène sur la migration spontanée en tube capillaire.

3.1.3. Etude de l'action du lévamisole sur la migration spontanée en tube capillaire.

3.2. CHIMIOTACTISME -

3.2.1. Etude du chimiotactisme spontané en fonction du temps.

3.2.2. Etude du chimiotactisme en présence et en absence de substance cytotaxigène.

3.2.3. Etude du chimiotactisme en présence de médicaments seuls ou avec des substances cytotaxigènes.

3. ANALYSE DES RESULTATS ET ETUDE STATISTIQUE

3.1... MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE -

Les tests utilisés sont :

- pour la migration en tube capillaire : analyse de la variance - méthodes des couples.
- pour le chimiotactisme : tests non paramétriques tels que : test des signes
analyse non paramétrique de la variance de Friedman.

3.1.1. ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE EN FONCTION DU TEMPS -

Cette étude est répétée 9 fois à 15 jours d'intervalle chez 9 sujets sains (4 hommes et 5 femmes) et les résultats figurent dans le tableau II.

Le test appliqué à cette étude est l'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés (jour, individu) et à 3 répétitions.

Cette analyse montre que les différences observées entre les jours (j1, j2, j3) pour le même individu d'une part et entre les individus d'autre part, sont significatives au seuil 5 % ; donc la migration spontanée est variable :

- pour le même individu au cours du temps ;
- d'un individu à l'autre.

(Les résultats figurent dans le tableau XII).

La mise en évidence d'une variabilité entre les individus ne paraît pas très surprenante, tandis que la variabilité selon le jour du prélèvement chez un même individu constitue un fait remarquable. Elle pourrait être attribuée :

- soit aux méthodes expérimentales, bien qu'on ait toujours travaillé dans les mêmes conditions opératoires,
- soit à des variations de l'état physiologique de l'individu au moment du prélèvement sanguin ; les individus sont à jeûn au moment du prélèvement, mais des variations "physiologiques", comme le cycle menstruel chez les femmes, peuvent intervenir.

Il nous restera à prouver que ces variations "physiologiques" n'enlèvent pas d'intérêt à ce test utilisé comme moyen d'étude de l'action d'un médicament.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE
(ANALYSE DE LA VARIANCE)

sources de variation	degré de liberté	somme des carrés des écarts	variance	F calculé	caractère significatif
individu	8	389236	48655	23,14	++
jour	12	277402	138701	66	++
interaction individu/jour	16	284202	17763	8,45	++
Résiduelle	81	170300	2102,47		
Totale	107	1121140			

3.1.2. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE -

- Etude de l'action du Kétoprofène sur la migration spontanée en fonction du temps :

Dans notre étude de l'action du Kétoprofène sur la migration en tube capillaire, nous avons dans un premier temps, vérifié l'action du produit en fonction du temps chez 8 sujets chez lesquels le test est répété 2 fois à 30 jours d'intervalle. Cinq doses ont été testées (20, 50, 100, 200, 500 µg).

Les résultats figurent dans le tableau III.

Nous avons utilisé la méthode des couples pour comparer l'action du Kétoprofène au jour j1 et j2 chez les mêmes individus.

Les résultats figurent dans le tableau XIII.

Nous avons obtenu une valeur de $0,23 < 1,96$, donc la différence entre les mesures réalisées au j1 et j2 n'est pas significative au seuil 5 % et même au seuil 1 % pour aucune des doses testées, alors que la migration spontanée variait pour le même individu, au cours du temps ; l'indice de migration :

$$IM = \frac{\text{surface de migration en présence du Kétoprofène}}{\text{surface de migration en absence du Kétoprofène}}$$

présente un caractère constant pour le même individu.

Ce qui élimine l'interaction dans ce test des variations "physiologiques" mise en évidence dans l'étude de la migration spontanée.

Bien que l'intervalle de 30 jours entre 2 prélèvements représente un laps de temps suffisamment important pour être significatif, une étude portant sur 3 ou 4 prélèvements aurait été, peut-être, souhaitable statistiquement.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE
SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE

(Méthode des couples)

J1	J2	J1 - J2
1,03	0,93	0,10
1,03	1,06	- 0,03
1,10	0,75	0,35
0,95	0,85	0,10
0,80	0,78	0,02
0,96	0,79	0,17
0,96	0,90	0,06
0,95	0,80	0,15
0,92	0,89	0,03
1,22	0,89	0,33
0,85	0,80	0,05
1,82	1,24	0,58
1,88	1,22	0,66
1,17	1,28	- 0,11
1,15	1,13	0,02
0,90	0,98	- 0,08
0,99	0,96	0,03
1,032	0,93	0,10
1,22	1,21	- 0,01
0,83	0,95	- 0,12
0,80	0,95	- 0,15
0,98	0,80	0,12
0,90	1,27	- 0,37
0,90	0,71	0,19
0,75	0,88	- 0,13
0,76	0,89	- 0,13
0,90	0,63	0,27
0,61	0,72	0,11
1,23	0,51	0,72
1,49	0,88	0,61
0,98	0,69	0,29
0,63	1,11	- 0,48
0,72	1,08	- 0,36
0,70	0,93	- 0,23
0,56	1,15	- 0,59
1,21	0,95	0,26
0,95	0,85	0,10
0,98	1,10	- 0,12
0,86	0,92	- 0,06

- Etude de l'action du Kétoprofène chez différents sujets et à différentes doses :

Les résultats obtenus par la méthode des couples permettent de considérer les mesures effectuées au j1 et j2, comme des répétitions.

Les résultats figurent dans le tableau III.

Il est donc possible d'appliquer le test d'analyse de la variance à 2 facteurs contrôlés (dose, individu) et à 2 répétitions (j1 et j2) dans l'étude de l'action du Kétoprofène, chez 8 sujets en présence de 5 doses.

Les résultats figurent dans le tableau XIV.

Cette analyse montre :

- . effet dose : il n'y a pas de différence significative entre les doses utilisées ;
- . effet individu : il apparaît une différence significative entre les individus, donc le médicament agit différemment selon les individus.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE
SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE

(Analyse de la variance)

Sources de variation	degré de liberté	somme de carré des écarts	variance	F calculé	caractère significatif
individus	7	1,41	0,20	3,33	+
doses	4	0,09	0,02	1	-
interaction	28	0,98	0,03	1	-
résiduelle	41	2,55	0,06		
totale	80	5,03			

- Etude de l'action du Kétoprofène sur la migration spontanée en fonction de l'individu :

Les valeurs obtenues pour chaque individu constituent une population homogène, dont on calcule la moyenne.

Ce qui va permettre de tester l'effet du Kétoprofène en comparant la moyenne observée à une moyenne théorique, par un test "student t".

Les résultats figurent dans le tableau XV.

Pour cela , on part de l'hypothèse H_0 : le médicament n'exerce pas d'effet ; sous cette hypothèse, l'indice de migration = 1.

On compare la moyenne observée à la moyenne théorique 1.

On applique la formule suivante :

$$t_{(n-1)ddl} = \frac{m - \mu}{s/\sqrt{N}}$$

On constate que le médicament agit chez certains individus (4/8).

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN
TUBE CAPILLAIRE (test student t)

Sujets	20 µg	50 µg	100 µg	200 µg	500 µg	somme	moyenne	t calculé	caractère significatif
1	1,96	1,09	1,85	1,80	1,58	8,28	0,83	2,62	+
2	1,75	1,86	1,75	1,81	1,65	8,82	0,88	2,75	+
3	3,06	3,10	2,45	2,28	1,88	12,77	1,27	3,47	+
4	1,95	1,96	2,43	1,78	1,75	9,87	0,98	0,31	-
5	1,84	2,17	1,61	1,63	1,65	8,90	0,89	2,48	+
6	1,53	1,33	1,74	2,37	1,67	8,64	0,86	1,53	-
7	1,74	1,80	1,63	1,71	2,16	9,04	0,90	1,47	-
8	1,73	2,11	1,80	2,08	1,78	9,50	0,95	1,31	-

3.1.3. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE -

Au cours de notre étude, nous avons testé l'action du lévamisole chez 10 sujets sains et à 4 doses différentes.

Les résultats figurent dans le tableau IV.

Le test statistique appliqué à cette étude est l'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés (individu, dose).

Les résultats figurent dans le tableau XVI.

Cette analyse montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les doses utilisées ; ce qui permettrait dans une étude de l'action du lévamisole sur la migration spontanée en tube capillaire, en fonction du temps, de n'utiliser qu'une seule dose.

Mais il ressort de l'analyse de la variance, qu'il y a une différence significative entre les individus ; cependant la faible moyenne des répétitions ne nous permet pas de faire une interprétation statistique.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LA MIGRATION SPONTANEE
EN TUBE CAPILLAIRE (Analyse de la variance)

SV	ddl	SCE	CM	F	Caractère significat.
dose	3	0,05	0,017	0,43	-
individu	9	2,04	0,267	6,68	+
résiduelle	27	1,08	0,04		
totale	39	3,17			

3.2. CHIMIOTACTISME

3.2.1. ETUDE DU CHIMIOTACTISME SPONTANE * EN FONCTION DU TEMPS -

Cette étude du chimiotactisme est répétée 4 fois chez 5 sujets sains. Les résultats figurent dans le tableau V.

Le test statistique appliqué à cette étude est l'analyse non paramétrique de la variance de Friedman.

$$x^2 = \frac{12}{NK (K + 1)} \quad \begin{array}{c} K \\ \diagdown \\ \diagup \\ \diagdown \\ \diagup \\ j = 1 \end{array} \quad (R_j^2) - 3N (K + 1)$$

$$x^2 = 4,2 \quad \text{ddl} = 3$$

Il ressort que les différences observées entre les résultats obtenus pour les 4 répétitions ne sont pas significatives au seuil 5 % ($p > 0,2$).

Donc le test est reproductible au cours du temps chez un même individu.

* le mot "spontané" signifie l'absence de substance cytotoxigène.

3.2.2. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN PRESENCE ET EN ABSENCE DE SUBSTANCES CYTOTAXIGENES.

Cette étude est pratiquée chez 13 sujets sains.

Les résultats figurent dans le tableau VI.

Le test statistique pratiqué pour cette étude est la comparaison des 2 moyennes selon la formule.

$$\xi = \frac{mA - mB}{\sqrt{\frac{SA^2}{nA} + \frac{SB^2}{nB}}}$$

$$\xi = 1,28 < 1,96$$

Le test est non significatif : donc les gamma-globulines ne stimulent pas le chimiotactisme d'une manière significative dans le cadre de notre expérimentation.

3.2.3. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN PRESENCE DE MEDICAMENTS SEULS OU AVEC DES SUBSTANCES CYTOTAXIGENES -

Les tests statistiques appliqués à cette étude sont :

- le test des signes de la différence du nombre de polynucléaires seuls et du nombre de polynucléaires + produit pour l'étude de l'effet du médicament seul.
- le test des signes de la différence des indices :

PN + produit

PN

PN + produit + GGA

PN + GGA

pour l'étude de l'effet du médicament en présence de substances cytotoxigènes.

. Etude de l'action du Kétoprofène sur le chimiotactisme :

Cette étude est pratiquée chez 9 sujets sains à la dose de 50 µg/ml. Les résultats figurent dans le tableau VII.

- Etude de l'action du Kétoprofène seul

Il ressort de l'analyse statistique que le test est non significatif au seuil 5 % ($p = 0,1$). Les résultats figurent dans le tableau XVII.

Donc le Kétoprofène ne diminue pas le chimiotactisme des polynucléaires.

- Etude de l'action du Kétoprofène en présence de substances cytotoxigènes

Le test est non significatif au seuil 5 % ($p = 0,1$).

Les résultats figurent dans le tableau XVIII.

Donc, le Kétoprofène en présence de substances cytotoxigènes ne diminue pas le chimiotactisme des polynucléaires.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LE CHIMIOTACTISME
(test des signes)

Nb. PN / champ	VES.	HEL.	CHA.	CAT.	JOC.	NAD.	BER.	BEC.	MIC.	caractère significatif
PN	5,6	13	16,1	6	7	57	35	11	21	
PN + 50 µg Kétoprofène	6	6,8	6,2	3	5	19	61	10	18	
signe	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-

PN	17,6	62	26,1	7	7,5	89	50	51	101,1	
PN + 50 µg Kétoprofène	7	8,8	6,55	3,35	11,8	32	75	10	18	
signes	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-

Filtres

Filtres
+
cuves

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE 50 µg/ml
EN PRESENCE DE SUBSTANCE CYTOTAXIGENE SUR LE CHIMIOTACTISME (test des signes)

Filtres										
<i>Sujets</i> indice	VEY.	HEL.	CHA.	CAT.	JOC.	NAD.	BER.	BEC.	MIC.	caractère significatif
PN + Kétoprofène	1	0,53	0,37	0,5	0,71	0,33	1,74	0,9	0,85	
PN + IgG + Kétoprofène	0,5	0,52	0,41	0,33	0,5	0,7	0,49	0,7	0,31	
PN + IgG										
Signes	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

Filtres + cuves										
<i>Sujets</i> indice	VEY.	HEL.	CHA.	CAT.	JOC.	NAD.	BER.	BEC.	MIC.	caractère significatif
PN + Kétoprofène	0,41	0,14	0,24	0,47	1,5	0,35	1,5	0,16	0,22	
PN + IgG + Kétoprofène	0,43	0,25	0,43	0,33	0,43	0,63	0,48	0,71	0,31	
PN + IgG										
Signes	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

. Etude de l'action de l'acide acétyl salicylique sur le chimiotactisme :

Cette étude est pratiquée sur 10 sujets sains à la dose de 1.000 µg/ml. Les résultats figurent dans le tableau VIII.

- Etude de l'action de l'acide acétyl salicylique seul

L'analyse statistique montre que le test est non significatif au seuil 5 % ($p > 0,9$). Les résultats figurent dans le tableau XIX.

Donc l'acide acétyl salicylique ne diminue pas, à la dose utilisée, le chimiotactisme des polynucléaires.

- Etude de l'action de l'acide acétyl salicylique en présence de substances cytotoxigènes

Il ressort de l'étude statistique que le test est non significatif au seuil 5 % ($p = 0,1$).

Les résultats figurent dans le tableau XX.

On constate que l'acide acétyl salicylique en présence de substance cytotoxigène ne diminue pas le chimiotactisme des polynucléaires.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACETYL SALICYLIQUE SUR
LE CHIMIOTACTISME (test des signes)

Filtres												
<i>su jets</i> Nb. PN / champ		VEY.	M.A.	CHA.	CAT.	JOC.	BER.	NAD.	MIC.	BEC.	caractère significatif	
PN		16	15	25	49	18	22	15	37	18		
PN + 1000 µg ac.acétyl.sal.		23	12	36	25	14	47	21	19	23		
signe		-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	
Filtres + cuves												
<i>su jets</i> Nb. PN / champ		VEY.	M.A.	CHA.	CAT.	JOC.	BER.	NAD.	MIC.	BEC.	caractères significatif	
PN		26,8	18,6	76	68,4	18,6	26	17	100	104,8		
PN + 1000 µg acide acétyl salicylique		37,6	12,4	92	43	18	47,6	23,4	22,8	76		
signes		-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACETYL SALICYLIQUE 1000 µg/ml
EN PRESENCE DE SUBSTANCE CYTOTAXIGENE SUR LE CHIMIOTACTISME (test des signes)

Filtres											
Sujets indice		VEY.	M.A.	CHA.	CAT.	JOC.	BER.	NAD.	MIC.	BEC.	caractère significatif
PN + acide acétyl salic. PN		1,4	0,8	1,44	0,51	0,77	2,13	1,4	0,5	1,27	
PN + IgG + ac.acétyl.sal. PN + IgG		0,7	0,5	1,17	0,7	0,76	1,45	0,76	0,26	1,45	
signes		+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Filtres + cuves											
Sujets indice		VEY.	M.A.	CHA.	CAT.	JOC.	BER.	NAD.	MIC.	BEC.	caractère significatif
PN + acide acétyl salic. PN		1,4	0,66	1,2	0,62	0,96	1,8	1,3	0,22	0,72	
PN + IgG + ac.acétyl.sal. PN + IgG		0,79	0,63	0,20	0,74	0,73	1,2	0,62	0,71	1,4	
signes		+	+	+	-	+	+	+	-	-	-

. Etude de l'action du tiemonium sur le chimiotactisme

Cette étude est pratiquée chez 10 sujets sains à la dose de 1 g/ml. Les résultats figurent dans le tableau IX.

- Etude de l'action du tiemonium seul

L'analyse statistique montre que le test est significatif au seuil 5 % ($p = 0,01$). Les résultats figurent dans le tableau XXI.

- Etude de l'action du tiemonium en présence de substances cytotoxigènes.

Le test est significatif au seuil 5 % ($p = 0,02$).

Les résultats figurent dans le tableau XXII.

Donc le tiemonium diminue le chimiotactisme des polynucléaires en présence et en absence de substance cytotoxigène, dans les conditions opératoires réalisées.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM 1 µg/ml SUR LE CHIMIOTACTISME

(test des signes)

Filtres

Nb. / PN / champ <i> Sujets</i>	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
PN	15	20	13,4	12,6	23	11,8	14	15	19	18,5	
PN + 1 µg tiemonium	12	16	12,8	9	18	7,2	10,6	11,1	14	12,2	
signes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Filtres
+
cuves

Nb. / PN / champ <i> Sujets</i>	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
PN	20	30	13,8	15,6	29,5	11,8	14,6	17,3	32	22	
PN + 1 µg tiemonium	12	29,5	13	9,4	19,3	7,2	11,6	11,1	14	12,2	
signes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM 1 µg/ml EN PRESENCE DE SUBSTANCE
CYTOTAXIGENE SUR LE CHIMIOTACTISME

<i>sujets</i> indice	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
PN + tiemonium N	0,8	0,8	0,96	0,71	0,78	0,61	0,76	0,73	0,73	0,66	
PN + IgG + tiemonium	0,61	0,61	0,62	0,85	0,58	0,61	0,66	0,56	0,66	0,60	
PN + IgG											
signes	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Filtres

<i>sujets</i> indice	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
PN + tiemonium PN	0,6	0,98	0,94	0,60	0,65	0,61	0,79	0,64	0,43	0,55	
PN + IgG + tiemonium	0,48	0,52	0,70	0,86	0,51	0,60	0,59	0,52	0,29	0,36	
PN + IgG											
signes	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Filtres
+
cuves

- Etude de l'action du lévamisole sur le chimiotactisme :

Cette étude est pratiquée chez 10 sujets sains à la dose de 30 µg/ml (le tableau X) et à la dose de 150 µg (tableau XI).

- Etude de l'action du lévamisole seul

Il ressort de l'analyse statistique :

- . à la dose de 30 µg/ml, le test est significatif au seuil 5 % ($p = 0,001$), les résultats figurant dans le tableau XXIII.

donc, le lévamisole à cette dose diminue le chimiotactisme des polynucléaires.

- . à la dose de 150 µg/ml, le test est non significatif au seuil 5 % ($p = 0,8$), les résultats figurant dans le tableau XXIV.

donc, le lévamisole à cette dose, ne diminue pas le chimiotactisme des polynucléaires.

- Etude de l'action du lévamisole en présence de substance cytotaxigène

- . à la dose de 150 µg/ml, le test est non significatif au seuil 5 % ($p = 0,5$) ; les résultats figurent dans le tableau XXVI.

donc le lévamisole à cette dose, et en présence de substance cytotaxigène ne diminue pas le chimiotactisme des polynucléaires.

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE 30 µg/ml SUR LE CHIMIOTACTISME
(test des signes)

Nb. ~~sujets~~ PN / champ		M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
PN		15	20	16	39,7	23	11,8	14	14,9	19	18,5	
PN + 30 µg lévamisole		10	13	13	31	12,7	9,1	13	12,8	14	9,6	
signes		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Filtres

Nb. ~~sujets~~ PN / champ		M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
PN		20	30	18	100,7	29,5	11,8	14,6	17,3	32	22	
PN + 30 µg Lévamisole		12	13,5	13,4	55	15,7	9,1	13,1	12,8	14	9,6	
signes		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Filtres
+
cuves

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE 150 µg
SUR LE CHIMIOTACTISME (test des signes)

Filtres

Nb. PN / champ <i>Sujets</i>	M.C.	CAT.	ANN.	MAU.	YVE.	HEL.	M.A.	MIC.	ADE.	MIE.	caractère significatif
PN	23,8	38,5	10	17,2	37,4	27,4	27,4	72	42	7,4	
PN + 150 µg lévamisole	32,2	25,1	12,2	39	64	8,6	7	13,4	12,8	5	
signes	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-

Filtres + cuves

Nb. PN / champ <i>Sujets</i>	M.C.	CAT.	ANN.	MAU.	YVE.	HEL.	M.A.	MIC.	ADE.	MIE.	caractère significatif
PN	68,8	205,8	15,8	39,2	218,8	123,6	68	111,2	100	8	
PN + 150 µg lévamisole	49,2	57,2	14,2	69	103,4	9,4	7	14,8	19,6	5	
signes	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

ANALYSE STATISTIQUE DE L'ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE 30 µg/ml EN PRESENCE DE SUBSTANCE
CYTOTAXIGENE SUR LE CHIMIOTACTISME (test des signes)

Filtres	indice	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
	<i> Sujets</i>											
	PN + 30 µg lévamisole	0,67	0,65	0,81	0,78	0,57	0,75	0,93	0,86	0,74	0,52	
	PN											
	PN + IgG + lévamisole	0,57	0,57	0,49	0,78	0,56	0,70	0,79	0,68	0,67	0,56	
Filtres + cuves	PN + IgG											
	signes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Filtres + cuves	indice	M.A.	MAU.	JOC.	CAT.	YVE.	JOS.	BER.	CHA.	MIC.	CLA.	caractère significatif
	<i> Sujets</i>											
	PN + 30 µg lévamisole	0,60	0,45	0,74	0,54	0,53	0,77	0,89	0,73	0,43	0,43	
	PN											
	PN + IgG + lévamisole	0,47	0,48	0,45	0,41	0,50	0,69	0,67	0,64	1,0	0,36	
Filtres + cuves	PN + IgG											
	signes	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Filters

Filtres
+
cuves

<i>sujeets</i> indice	M.C.	CAT.	ANN.	MAU.	YVE.	HEL.	M.A.	MIC.	ADE.	MIE	caractère significatif
N + 150 µg lévamisole	0,71	0,27	0,89	1,76	0,47	0,07	0,10	0,13	0,19	0,62	
pN											
N + IgG + lévamisole	1,02	0,25	1,25	0,55	1,28	0,19	0,11	0,17	0,15	1	
N + IgG											
signes	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-

DISCUSSION

COMMENTAIRES TECHNIQUES SUR LES METHODES -

Plusieurs méthodes sont proposées pour mesurer la migration spontanée.

On s'accorde à reconnaître que selon que la migration spontanée est mesurée par une méthode de migration hors tube capillaire ou par une méthode de migration à travers filtre, les résultats obtenus diffèrent. Ces deux méthodes ne mettent pas en évidence le même phénomène puisque ces deux migrations sont reconnues par MILLER (136,138) correspondre à des mécanismes différents.

A la suite des travaux de KETCHEL, la migration en tube capillaire est beaucoup pratiquée. Les études de GEORGE et VAUGHAN, complétées par SOBORG et BENDIXEN, ont apporté une méthodologie un peu différente sous forme de migration horizontale qui facilite l'incubation avec les substances testées. Cette méthode nous a paru convenir à notre étude.

Cependant, la migration horizontale, comme la migration verticale, n'évite pas le risque d'erreur que constitue la formation de micro-agglutinats cellulaires et reste liée à l'adhésivité cellulaire, que celle-ci soit une adhésivité de surface ou s'exerce de cellule à cellule (118). La mise en évidence de ce système de l'activité inhibitrice ou stimulante d'une drogue ne pourra être analysée qu'en tenant compte de l'interréaction migration - adhérence sans qu'il soit possible de préciser le phénomène cible.

Dans notre étude, bien que la migration s'amorce immédiatement et que l'aire de migration soit lisible et définitive après 6 heures d'incubation, la lecture de la migration n'est effectuée qu'après 18 heures d'incubation. L'évaluation de la migration se fait par la mesure de la totalité de l'aire de migration. Celle-ci apparaît sous forme d'un "halo" comportant une zone intérieure dense entourée d'une zone peu dense qui est composée essentiellement de polynucléaires neutrophiles, comme l'indiquent ROSENBERG (174) et DREVON (56). L'aire totale du "halo" de migration est donc bien l'expression de la migration neutrophile.

La chimiotaxie, au cours de ce travail, a été étudiée à l'aide d'une technique de BOYDEN, mais nous avons adopté, en vue d'une meilleure quantification, la variante proposée par FREI (63) qui comporte deux comptages de cellules (sous filtre et sur fond de cuve). Selon KELLER (108), cette double lecture améliore considérablement la reproductibilité de la méthode. Nous avons fait des évaluations comparatives de la migration à travers filtre en pratiquant les deux modes de lecture et nous les avons notés. Les cellules retrouvées en fond de cuve sont en nombre variable et imprévisible. Cela apparaît dans le tableau suivant.

	VEY		HEL		CHA		NAD		BEC		MIC		MOYENNE	
	F	F + C	F	F + C	F	F + C	F	F + C	F	F + C	F	F + C	F	F + C
PN	5	17	13	62	16	26	57	89	11	51	21	80	15	40
PN + PRO- DUIT	6	7	6	8	6	6	19	32	10	10	18	18	8	10

Ce tableau montre qu'avec la technique de FREI on numère toutes les cellules ayant migré à un moment donné et qu'une double lecture sensibilise l'évaluation du chimiotactisme.

Ceci peut expliquer les variations de l'index chimiotactique en fonction du temps de migration, mises en évidence par HILL (90) et qui se traduisent par une diminution du chimiotactisme après 3 heures d'incubation avec le facteur chimiotactique. Cette diminution paraît due au détachement des polynucléaires neutrophiles. Ce détachement augmente avec la durée d'incubation et ce pourcentage de cellules détachées peut varier d'un sujet à l'autre (35 à 95 % selon FREI).

Deux modalités d'introduction du médicament dans ces tests d'étude de la migration sont possibles : une pré-incubation des polynucléaires avec le médicament, suivie de lavages, précède le test proprement dit, ou bien l'incubation coïncide avec la migration elle-même et assure le contact direct de celui-ci avec les cellules en train de migrer.

Nous n'avons pas choisi la pré-incubation parce qu'elle prolonge le temps de manipulation des cellules, nécessite des lavages et constitue donc une source de perturbation de la vitalité cellulaire. En effet, PATTERN (150) et HILL (90) ont montré que des modalités techniques - mode de prélèvement - qualité de l'anticoagulant - méthode de séparation - peuvent avoir des répercussions sur la migration, et qu'en particulier les lavages modifient la membrane des polynucléaires d'une manière irréversible. Or, on sait que l'adhésivité et la migration sont étroitement dépendantes des charges de surface de la cellule (71).

Les concentrations de médicaments testées ont été calculées d'après la dose thérapeutique. Nous appelons dose thérapeutique la dose moyenne par prise de médicament pour

un adulte. Cette dose correspond à une concentration sanguine du médicament qui est calculée d'après le volume sanguin et ramenée au millilitre de sang circulant.

Les doses utilisées sont variables selon les médicaments et selon le test. Elles sont, dans le test de migration en tube capillaire, égales à la concentration sanguine ou supérieures (2 à 5 fois). Pour le ketoprofène et le lévomisole, nous avons également testé des doses nettement supérieures mais jamais toxiques pour la cellule. Dans le test d'étude chimiotactique, la concentration de médicament utilisée représente au maximum 5 fois la concentration sanguine après une prise de médicament. En utilisant ces doses, nous avons pensé placer notre expérimentation dans des conditions proches des conditions thérapeutiques.

Au début de notre travail, nous avons vérifié que les deux méthodes d'étude de la migration que nous avons choisies, convenaient bien à l'expérimentation projetée. A notre avis, deux facteurs interviennent et déterminent leur valeur et leur fiabilité : seules, la reproductibilité des techniques et la stabilité de la réponse cellulaire chez un sujet sain peuvent permettre l'utilisation et l'interprétation des résultats.

En ce qui concerne la migration spontanée, l'étude statistique faite sur les résultats obtenus chez 9 sujets testés 3 fois en 45 jours montre qu'il existe une variabilité entre les individus et une variation au cours du temps pour un même sujet (tableaux II et XII). La représentation graphique des réponses obtenues le montre clairement (figure 13).

On peut rapprocher de ces résultats les observations faites par RICHENS (167) sur la migration spontanée de sujets testés plusieurs fois en 24 heures. Les fluctuations mises en évidence ont été rattachées par cet auteur

aux variations du nombre des cellules blanches circulantes ainsi qu'aux taux de cortisol ; mais elles n'auraient, selon RICHENS, pas de répercussion sur l'inhibition de la migration des leucocytes induite par antigène dont le mécanisme ne serait pas sensible au rythme circadien. Les variations de la migration des polynucléaires neutrophiles observées chez un même sujet bien portant prélevé plusieurs fois sur une période de 6 semaines trouvent peut-être là une explication, mais là également nous avons noté que ces variations n'affectent pas l'index de migration exprimant l'action du médicament sur la migration cellulaire.

En ce qui concerne le chimiotactisme, nous avons pratiqué une étude répétitive (4 tests) chez 5 sujets, sur une période de 60 jours. Les résultats figurent dans le tableau V. L'analyse non paramétrique de la variance de FREEDMAN montre que les différences observées entre les résultats obtenus pour les 4 répétitions ne sont pas significatives au seuil de 5 %.

Le test du chimiotactisme pratiqué selon les modalités proposées par FREI donne des résultats reproductibles au cours du temps chez un même individu, ce qui prouve la reproductibilité de la méthode et la stabilité de la chimiotaxie chez un sujet bien portant. Nos résultats confirment ceux de HILL qui, étudiant la chimiotaxie au jour le jour, pendant 5 jours, chez 4 sujets, l'avait trouvé stable.

ANALYSE DES RESULTATS -

Dans l'étude du KETOPROFENE dans son action sur la migration spontanée, nous avons pu montrer que, chez un même sujet, l'action du médicament exprimée sous forme d'indice de migration :
$$\frac{\text{migration en présence de médicament}}{\text{migration en l'absence de médicament}}$$
 ne varie pas en fonction du temps (tableaux III et XIII).

Par contre, l'étude statistique (analyse de la variance) fait ressortir une différence significative entre les individus, ce qui montre que l'action du médicament s'exerce différemment d'un individu à l'autre (tableaux III et XV). Les polynucléaires de 4 sujets parmi les 8 étudiés restent insensibles à l'action du médicament, ceux de 3 sujets ont une migration inhibée, tandis que la migration des polynucléaires du dernier sujet est stimulée par le ketoprofène.

L'analyse de la variance montre qu'il n'y a pas de différence significative entre l'action des doses testées (tableau XIV). Néanmoins, l'observation des deux graphiques (figures 14 et 15), qui représentent les résultats obtenus à deux dates différentes pour les mêmes concentrations du ketoprofène et chez les mêmes sujets, montre que les variations les plus remarquables se trouvent pour les concentrations allant de 20 à 200 $\mu\text{g/ml}$: les sujets présentent un maximum de réaction (en plus ou moins), alors que pour les concentrations élevées (de 200 à 500 $\mu\text{g/ml}$) l'action du médicament semble s'amoindrir chez tous les sujets.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus dans une étude récente sur un médicament anti-inflammatoire du même groupe : l'ibuprofène. L'action de l'ibuprofène sur la migration des polynucléaires humains en tube capillaire se traduit par une inhibition de la migration, mais qui n'apparaît qu'à des doses élevées très supérieures à la dose thérapeutique et se montre également très sensible au facteur individuel.

L'action du ketoprofène sur le chimiotactisme des polynucléaires en chambre de BOYDEN a été testée par une seule concentration de médicament. Nous avons choisi la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ correspondant à deux fois la dose thérapeutique ramenée au millilitre de sang circulant. Les résultats figurent dans le tableau VII.

L'étude des moyennes suggère qu'il existe une action inhibitrice du ketoprofène sur la migration des polynucléaires en présence de cytotaxine, aussi bien qu'en présence de cytotaxigène, puisque dans les deux cas deux fois moins de cellules migrent en présence du médicament. Sur les 9 sujets testés, les polynucléaires de 7 ont leur chimiotactisme diminué en présence de cytotaxine, tous ont leur chimiotactisme diminué en présence de cytotaxigène (figure 17). Cependant, de l'étude statistique faite par le test des signes, il ne ressort pas que cette action inhibitrice soit significative à la dose étudiée (tableaux XVII et XVIII).

Au cours de ce travail, nous avons étudié la seule action de l'ACIDE ACETYL-SALICYLIQUE sur la migration dirigée, puisque deux études effectuées récemment dans le laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon concernaient l'action de ce médicament sur la migration spontanée du polynucléaire. Le chimiotactisme a été étudié en présence de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ d'acide acétyl-salicylique, qui est une dose intermédiaire parmi celles testées en migration spontanée et ne présente aucune toxicité pour le polynucléaire.

Le tableau VIII et la figure 18 montrent que l'action de l'acide acétyl-salicylique est très variable d'un sujet à l'autre, en présence aussi bien qu'en l'absence de substance cytotaxigène. L'action inhibitrice qui semble ressortir de la moyenne établie sur nos sujets n'est pas confirmée par le test des signes (tableaux XIX et XX). C'est également la notion qui se dégage d'une étude faite sur l'action de l'acide acétyl-salicylique à la dose de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ sur le chimiotactisme des polynucléaires de lapin, qui est qualifiée de douteuse par BOREL (25).

Par contre, les différentes études qui concernent l'action de l'aspirine sur la migration spontanée en tube capillaire mettent en évidence un effet inhibiteur de ce médicament.

MASSOUD (128) montre que l'action inhibitrice existe par une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$ et augmente au-delà de cette dose, mais semble ensuite coïncider avec un effet toxique. Dans cette même étude, MASSOUD met en évidence la sensibilité particulière que présentent les polynucléaires des sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde vis-à-vis de l'aspirine (ainsi qu'aux immunodépresseurs), puis que leur migration est significativement plus diminuée que celle des polynucléaires de sujets sains en présence des mêmes doses.

DREVON, étudiant l'activité de diverses molécules anti-inflammatoires, retrouve l'activité inhibitrice de l'acide acétyl-salicylique sur la migration des polynucléaires normaux et détermine l'existence d'une relation semi-logarithmique entre la concentration de l'anti-inflammatoire et la réponse leucocytaire (56). Ce même auteur montre qu'il ressort un certain "accord" entre les résultats obtenus dans le test de l'oedème à la carragénine et le test de la migration de leucocytes, ce qui suggère qu'ils sont, l'un et l'autre, l'expression du même mécanisme.

CORBERAND (42), utilisant la migration verticale en tube capillaire selon KETCHEL, fait également ressortir l'effet inhibiteur de l'aspirine à des concentrations allant de 20 à 2.000 $\mu\text{g/ml}$ et l'attribue à un effet pharmacologique du médicament. Par contre, l'étude de la migration des polynucléaires de sujets ayant reçu 1 g d'aspegic par voie intraveineuse donne des résultats moins constants puisque 14 résultats sont positifs et 6 négatifs. L'intervention d'un facteur individuel est aussi mise en évidence et confirmée par le fait que sensibilité ou absence de sensibilité au médicament sont retrouvées à plusieurs reprises chez chaque sujet.

D'autre part, Mac GREGOR (121) montre que, *in vitro*, l'incubation de polynucléaires humains avec des concentrations de 50 à 500 $\mu\text{g/ml}$ ne modifie pas l'adhérence de ces

cellules, mais que l'absorption de 1,2 g détermine, deux heures après, une diminution de l'adhésivité.

Les modalités de cette action inhibitrice de la migration des polynucléaires restent à être préciser. Elles pourraient s'exercer par une interférence du médicament dans le métabolisme carboné et dans la production d'ATP cellulaire, ce qui entraînerait la réduction des fonctions consommatrices d'énergie en un mécanisme semblable à celui décrit pour les monocytes par VIKEN (227).

Il nous a paru intéressant de vérifier si d'autres classes de médicaments présentaient une activité sur la migration des polynucléaires neutrophiles humains.

Notre étude de l'activité des médicaments antalgiques s'est heurtée à des problèmes de solubilité ou de toxicité : la pentazocine, le nozinan, la glafénine n'ont, de ce fait, pu être étudiés.

Par contre, le TIEMONIUM (viscéralgine), soluble et non toxique à la concentration correspondant à la dose thérapeutique, a été étudié à la concentration de 1 µg/ml dans le test du chimiotactisme. Les résultats de cette étude figurent dans le tableau IX.

Le chimiotactisme des polynucléaires de tous les sujets étudiés subit un effet inhibiteur significatif aussi bien en présence de cytotaxine qu'en présence de cytotaxigène (tableaux XXI et XXII). La figure 19 montre l'ensemble des réponses des sujets étudiés.

Nous avons également étudié l'action d'un immunostimulant non spécifique, le LEVAMISOLE, dont l'effet immunopotentialisateur est soumis à une analyse extensive (6, 166, 217, 181).

La migration en tube capillaire a été étudiée en présence de quatre concentrations (30 - 90 - 300 - 600 µg/ml) dont la concentration de 30 µg/ml était la concentration thérapeutique. Le tableau IV résume les résultats obtenus.

L'analyse statistique confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre les doses testées, alors que l'observation du graphique (figure 16) montre néanmoins que des variations remarquables correspondent à la dose de 300 $\mu\text{g/ml}$ qui pourrait être considérée comme la dose active. Mais on remarquera aussi que la réponse du lévamisole chez l'homme sain, lorsqu'elle existe, se traduit ou par une stimulation ou une inhibition de la migration spontanée.

Le chimiotactisme a été étudié en présence de 30 et 150 $\mu\text{g/ml}$ de lévamisole. L'observation des moyennes des résultats figurant aux tableaux X et XI montre que le lévamisole, à ces doses, diminue le chimiotactisme, et cette action se révèle plus importante à la dose de 150 $\mu\text{g/ml}$. Néanmoins, nous devons noter que ces deux groupes de 10 sujets n'étaient pas strictement identiques puisque seuls 5 sujets avaient participé aux deux tests. Ceci ne nous a pas permis de préciser par la méthode des couples si la différence d'action entre les deux doses est significative.

Les résultats obtenus avec la dose de 30 $\mu\text{g/ml}$, étudiés avec le test des signes, montrent que l'action inhibitrice du lévamisole est significative (tableaux XXII et XXV). Cette inhibition significative apparaît aussi bien au niveau de l'action de cytotoxines que de leur induction.

Les résultats obtenus avec la dose de 150 $\mu\text{g/ml}$ sont plus hétérogènes. Alors que tous les sujets avaient une réponse chimiotactique diminuée dans le groupe précédent, dans ce groupe l'action du lévamisole se traduit, pour certains sujets, par une inhibition, mais pour d'autres, par une stimulation de leur chimiotactisme. L'action du lévamisole, à cette dose, apparaît plus individuelle : 7 sujets ont une migration de leurs polynucléaires diminuée. Les trois autres présentent une réponse dissociée. Le caractère homogène de la réponse à l'action de 30 $\mu\text{g/ml}$ apparaît bien dans la figure 20.

Dans la figure 21, on note que la dissociation est plus marquée en l'absence de cytotaxigène . De ce fait, bien que la moyenne de ce groupe révèle une action inhibitrice, le test des signes reste non significatif (tableaux XXIV et XXVI).

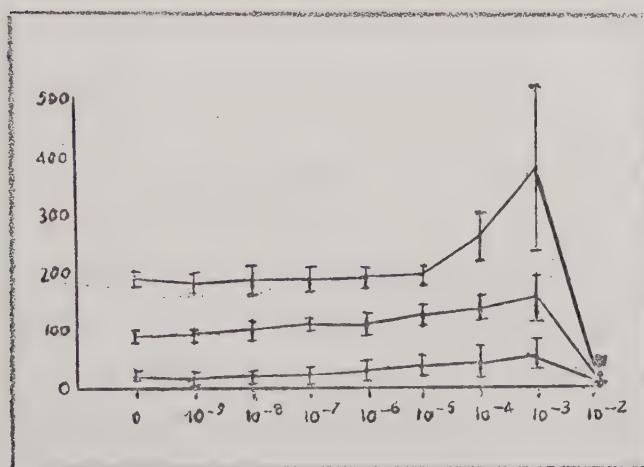
Lorsqu'on analyse l'ensemble des résultats obtenus chez les 5 sujets dont les polynucléaires ont été soumis aux deux concentrations du lévamisole, on remarque que, chez un même sujet, la sensibilité de ses polynucléaires au médicament se retrouve pour les deux doses. Nous avons schématisé l'ensemble des résultats obtenus chez ces 5 sujets dans le tableau XXVIII en faisant figurer les deux lectures.

- Tableau XXVIII -

	30 µg/ml		150 µg/ml	
	F	F + C	F	F + C
MA	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓
MAU	↓	↓ ↓	↑	↑ ↑
CAT	↓	↓ ↓ ↓	↓	↓ ↓ ↓ ↓ ↓
YVE	↓	↓ ↓	↑ ↑	↓ ↓
MIC	↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓

Quelques auteurs, très récemment, se sont intéressés à l'effet du lévamisole sur les fonctions phagocytaires, inductrices de la réponse immunitaire.

ANDERSON, dans un travail complet, a étudié l'action du lévamisole sur la mobilité de polynucléaires de 10 sujets, in vitro, en chambre de BOYDEN. Des concentrations de lévamisole allant de 10^{-3} à 10^{-4} M (200 à 20 $\mu\text{g/ml}$) ont été utilisées et leur action a été étudiée sur la mobilité au hasard (spontanée et stimulée) et sur le chimiotactisme (5) - (figure 23).



L'effet de différentes concentrations de lévamisole sur le chimiotactisme du polynucléaire neutrophile en présence du sérum activé par l'endotoxine (■) et la caséine (●) et sur la migration spontanée (+) (5).

Dans l'expérimentation d'ANDERSON, l'action du lévamisole se traduit par une augmentation de la migration spontanée et du chimiotactisme. L'augmentation de la migration spontanée est faible, et cela peut être rapproché de nos résultats.

En ce qui concerne le chimiotactisme, l'activité du lévamisole aux concentrations de 2 à 200 $\mu\text{g/ml}$ et après 3 heures d'incubation se traduit dans l'expérimentation d'ANDERSON par une action stimulante qui apparaît plus marquée sur le sérum activé par l'endotoxine que par la caséine. On remarquera qu'au delà de 200 $\mu\text{g/ml}$ l'action du lévamisole sur la migration s'inverse, ce qui pourrait correspondre à un effet toxique du lévamisole.

Cette action potentialisatrice du lévamisole sur le chimiotactisme détermine une augmentation de la migration spontanée et également une stimulation véritable amplifiant la migration unidirectionnelle. Le traitement au lévamisole

empêcherait la chute du taux de GMPc consécutif à la stimulation chimiotactique, sans que la montée du taux d'AMPc soit modifiée. Le maintien du taux intracellulaire de GMPc intensifierait l'assemblage des micro-tubules et, de ce fait, augmenterait la mobilité selon un processus où le calcium ne serait pas absent (5, 58, 70).

Par contre, dans une communication récente mais dépourvue de références méthodologiques, STECHEL a montré que des doses allant de 20 à 200 µg/ml inhibaient à 50 % le chimiotactisme des polynucléaires humains en présence de sérum humain activé. On retrouve chez le rat ayant reçu oralement du lévamisole cette inhibition de la chimiotaxie des polynucléaires, accompagnée d'une augmentation de l'adhérence sur fibre de nylon (203).

La disparité des résultats obtenus dans l'étude in vitro de la mobilité du polynucléaire traité au lévamisole peut être attribuée à des conditions méthodologiques différentes, en particulier celle concernant l'incubation avec le médicament et au fait que ces études très récentes n'aient porté que sur un petit nombre d'échantillons. Mais elle est à rapprocher des incertitudes qui se dégagent de l'étude des monocytes, ou même des lymphocytes humains, dont on discute encore si le lévamisole augmente ou laisse inchangées les capacités fonctionnelles (41, 180, 181, 226).

La raison de ces discordances pourrait tenir à ce que les effets du lévamisole ne sont pas constants et reproductibles d'un sujet à l'autre. D'après ANDRIEU (6), et nous l'avons constaté dans notre expérimentation, on peut mettre en évidence des sujets "répondeurs" et des sujets "non répondeurs" dont l'aptitude ou l'incapacité de réponse seraient liées à des caractéristiques génétiques ou pourraient correspondre à des variations du niveau de l'immunité cellulaire.

ESSAI D'INTERPRETATION -

Le mode d'action des anti-inflammatoires, et en particulier non stéroïdiens, reste peu clair malgré un usage intensif de ces médicaments. Plusieurs schémas ont été avancés pour expliquer l'action anti-inflammatoire de médicaments très différents par leur structure. On a considéré comme une hypothèse
de

travail valable que l'activité anti-inflammatoire était rattachable à une action sur le polynucléaire dont le rôle dans l'initiation et le maintien de la réaction inflammatoire n'est pas discuté.

Beaucoup de médicaments qui interfèrent sur les mécanismes de l'hôte modifient l'hématopoïèse et déterminent une neutropénie. Quelques médicaments cependant sont connus pour leur action directe sur les fonctions du polynucléaire et l'action des corticoïdes sur les mécanismes de défense des sujets recevant une corticothérapie est attribuée à une diminution de la chimiotaxie.

En ce qui concerne les anti-inflammatoires non stéroïdiens, différents modes d'action ont été envisagés : on a suggéré une action sur les médiateurs de l'inflammation par un antagonisme direct ou par inhibition de systèmes enzymatiques impliqués dans leur biogénèse (WHITHOUSE, 244). Mais, malgré les études faites par VAN ARMAN (222), par DI ROSA (52), sur des modèles expérimentaux comme l'oedème à la carragénine ou l'arthrite du rat, il ne semble pas que des preuves suffisantes aient été apportées (WINTER, 245).

Par contre, un certain nombre de faits permettent de penser que les anti-inflammatoires exercent leur action sur le polynucléaire. PHELPS (156) a mis en évidence l'action inhibitrice de l'indométacine sur la migration du polynucléaire chez le chien, et DI ROSA (52), étudiant la phénylbutazone, a montré que son action inhibitrice résultait, chez le rat, d'une augmentation de l'adhésivité cellulaire.

SOLBERG, récemment, a étudié l'influence d'une thérapeutique par la phényl-butazone sur la fonction granulocytaire chez l'homme et a montré qu'elle réduisait le pouvoir phagocytaire et bactéricide des polynucléaires du sujet, sans cependant étudier la migration cellulaire (196, 197). Mais BOREL, dans une étude systématique de l'action de divers médicaments sur le chimiotactisme des polynucléaires

du lapin, a été surpris de constater l'absence d'activité des anti-inflammatoires, et particulièrement de l'indométacine et de la phényl-butazone (25).

Dans notre expérimentation, le ketoprofène et l'acide acétyl-salicylique montrent une action inhibitrice de la migration spontanée et de la chimiotaxie des polynucléaires humains. Ces résultats confirment que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, quelle que soit la classe à laquelle ils appartiennent, exercent une action sur le polynucléaire au niveau des mécanismes assurant la locomotion de la cellule. Ce qui permettrait de "situer" avec WINTER l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens par rapport aux mécanismes de l'inflammation de la manière suivante :

<u>Symptômes de l'inflammation :</u>	<u>Action des médicaments :</u>
Infiltration cellulaire.	L'accumulation des polynucléaires n'est pas empêchée, mais la migration cellulaire est ralentie.
Interaction des cellules avec les substances produisant l'inflammation.	La phagocytose demeure, mais quelques réactions peuvent être retardées.
Changement de certaines propriétés physiques des cellules.	L'agglomération des polynucléaires persiste.
Les cellules s'agglomèrent.	
Les lysosomes sont libérés.	La libération des lysosomes peut être inhibée.
Les lysosomes sont brisés.	
Les enzymes lysosomiaux libèrent des "médiateurs".	La formation des médiateurs n'est pas empêchée.
Les médiateurs ont des effets toxiques.	

L'étude que nous avons faite sur l'action de deux médicaments autres qu'anti-inflammatoires semble ne pas permettre une interprétation aussi simple des phénomènes observés, puisque les doses thérapeutiques de l'immunostimulant

et de l'antalgique étudiés ont également montré une action inhibitrice de la migration du polynucléaire humain dans sa forme la plus complexe qu'est le chimiotactisme. Une interprétation plus large de l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la migration du polynucléaire humain est à rechercher : la migration est un phénomène membrane-dépendant et l'interaction cytotoxine-cellule se traduit par une modification des charges superficielles (71). La molécule médicamenteuse pourrait elle aussi interférer à ce niveau critique et modifier la rigidité du polynucléaire, lui faire perdre son aptitude à se déformer et à répondre à une stimulation chimiotactique de la même manière qu'un traitement à la trypsine modifie les fonctions du polynucléaire (136). Ce médicament pourrait également exercer une action inhibitrice, produisant un blocage de la glycolyse anaérobie selon un processus analogue à celui prêté au NIF (facteur immobilisant le neutrophile) et déterminant une diminution des activités cellulaires consommatrices d'énergie. Dans une étude récente faisant suite aux travaux de SOLBERG, KJOSEN d'ailleurs montre que la phényl-butazone modifie in vitro le métabolisme du glucose, inhibe les enzymes de la glycolyse et du shunt hexo-mono-phosphate, diminuant ainsi le pouvoir phagocytaire et bactéricide du polynucléaire (111).

Cependant, aucun de ces mécanismes d'action n'appartient en propre aux molécules anti-inflammatoires. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens exercent une action sur la migration du polynucléaire, mais un phénomène identique peut être observé pour toute molécule qui ou bien lèse sa membrane, ou bien affecte un de ses métabolismes essentiels.

Au cours de ce travail, comme CORBERAND dans son étude des effets de l'acide acétyl-salicylique sur la migration, nous avons été frappée du caractère individuel (et donc de la disparité) des réponses obtenues, et nous sommes amenée à penser que l'activité qu'un médicament peut avoir

vis-à-vis du polynucléaire, et en particulier sur sa mobilité, ne s'exerce qu'en fonction de la sensibilité de chaque sujet. Un facteur individuel intervient et module l'action du médicament. Ce facteur individuel peut déterminer la réactivité et le comportement du polynucléaire lui-même, mais peut être lié à une capacité plus ou moins grande de métabolisation du médicament présentée par le sujet.

L'utilisation du médicament lui-même dans une expérimentation in vitro en fausse obligatoirement l'interprétation, puisque ce sont ses métabolites qui rencontrent et réagissent avec le polynucléaire dans l'organisme, et l'on valoriserait considérablement les tests in vitro en y introduisant les métabolites connus du médicament.

A la fin de ce travail, nous sommes amenée à penser que l'appréciation in vitro de l'activité des anti-inflammatoires non stéroïdiens passe par l'étude de leur action sur les polynucléaires humains, mais que la migration représente un mécanisme sensible à l'action de trop nombreux facteurs. Il semble, par contre, que l'activité majeure des anti-inflammatoires non stéroïdiens s'exerce au niveau des activités métaboliques cellulaires initiatrices de l'inflammation, et que c'est donc là que doit être étudié le mode d'action de ces médicaments et, par là même, prouvé leur activité.

C O N C L U S I O N S

L'action in vitro de quelques médicaments sur la mobilité du polynucléaire neutrophile humain est étudiée à l'aide du test de la migration spontanée en tube capillaire, et de celui du chimiotactisme à travers filtre.

- Dans la première partie du travail, la reproductibilité des résultats obtenus à l'aide de ces deux techniques, est contrôlée et jugée satisfaisante pour l'étude envisagée : chez un individu, la réponse chimiotactique reste constante au cours du temps, et l'utilisation d'un indice de migration élimine les variations individuelles de la migration spontanée.

- Dans la deuxième partie du travail, l'action de deux anti-inflammatoires non stéroïdiens : Ketoprofène, Acide Acétyl Salicylique, est étudiée sur les polynucléaires de 10 sujets sains.

Le Ketoprofène, étudié aux concentrations de 20 - 50 - 100 - 200 - 500 $\mu\text{g/ml}$ a une action variable d'un sujet à l'autre : il inhibe ou augmente la migration spontanée. Cette action est indépendante de la concentration du médicament. Dans le test du chimiotactisme, la dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ du Ketoprofène provoque une inhibition du phénomène plus particulièrement en présence de substance cytotaxigène.

L'Acide Acétyl Salicylique a une action sur le chimiotactisme des polynucléaires à la dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$, qui se traduit par une inhibition de la migration en présence de cytotaxine ou de cytotaxigène.

- La troisième partie du travail comporte une étude analogue sur des médicaments non anti-inflammatoires : un antalgique (Le Tiemonium), un immunostimulant (Le Lévamisolé).

Le Tiemonium à la dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibe le chimiotactisme en présence de cytotaxine et de cytotaxigène.

Le Lévamisolé, étudié aux concentrations de 30 - 90 - 300 et 600 $\mu\text{g/ml}$, a une action variable d'un sujet à l'autre, il inhibe ou augmente la migration spontanée. Cette action est indépendante de la concentration du médicament.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R.
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LYON, LE 4 mars 1977

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,

Dans le test du chimiotactisme, la dose de 30 $\mu\text{g/ml}$ a une action inhibitrice, tandis qu'une dose élevée (150 $\mu\text{g/ml}$) stimule la réponse chimiotactique chez certains sujets.

Ces résultats témoignent que les médicaments testés peuvent avoir une action sur la mobilité spontanée, ou dirigée des polynucléaires mais que cette action semble plus sous la dépendance d'un facteur individuel que d'une activité propre au médicament.

S U M M A R Y

We studied two aspects of the mobility of polymorphonuclear cells from healthy people : random migration in capillary tube and chemotactism through filter.

This mobility was then investigated in the presence of list of drugs : non steroid anti-inflammatory drugs (ketoprofen, acetyl-salicylate), one antalgic drug (tiemonium), one immunostimulating drug (levamisole).

We concluded from our results that these drugs often had an inhibitory effect on the migration of polymorphonuclear cells, but that this inhibition depends on an individual factor.

B I B L I O G R A P H I E

1. ACKERMAN G.A. - Azurophil and specific granule formation in developing neutrophils in normal human bone marrow.
- Anat. Rec., 1971, 169, 265.
2. ADDISON L.E., J.W. BABBAGE - a raft technique for chemotaxis : a versatile method suitable for clinical studies.
- J. Immunol.Methods, 1976, 10, 385-388.
3. ADLER N. - Changes observed in mature granulocytes stained by the Feulgent method in différent age groups.
- Lancet, 1951, 2, 293.
4. ALPER C.A., ABRAMSON N., JOHNSTON R. - Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement mediated functions and C₃.
- New Eng. J. Med., 1970, 282, 349-354
5. ANDERSON R., GLOVER A.M., KOORUHOF H. - In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole : maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated levamisole treated neutrophils.
- Immunol., 1976, 117, 428-432.
6. ANDRIEU J.M.- le lévamisole stimulant du système immunitaire chez l'animal et chez l'homme.
- Path. Biol., 1977, 25, 57-66.
7. ATHENS J.W., RAAB S.D., HAAB O.P., MAUER A.M., ASHENBRUCKER H., CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M. - Leukokinetic studies III the distribution of granulocytes in the blood of normal subjects.
- J. Clin. Invest., 1961, 40, 159-173.
8. BAEHWER R.L., KARKOWSKI J.J., KARNOVSKY M.L. - Degranulation of leucocytes in chronic granulomatous disease.
- J. Clin. Invest., 1969, 48, 187.
9. BAINTON D.F., FARQUHAR M.G. - Origin of granules in polynuclear leukocytes. Two types derived from apposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes.
- J. Cell. Biol., 1966, 28, 277.
10. BAINTON D.F., FARQUHAR M.G. - Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leucocytes II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells.
- J. Cell. Biol., 1968, 39, 299.
11. BAINTON D.F., ULLYOT J.L. et FARQUHAR M.G. - The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow.
- J. Exp. Med., 1971, 134, 907.

12. BAUM J. - A simplified method for the measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes from human blood.
- J. Clin. Med., 1971, 77, 3.
13. BAUDMAN U., RYDGREN L., NORBERY B. - The difference between random movement and chemotaxis.
- Exp. Cell. Res., 1974, 88, 63-73.
14. BECKER E.L., WARD P.A. - Partial biochemical characterization of the activated esterase required in the complement dependent chemotaxis of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
- J. Exp. Méd., 1967, 125, 1021-1030.
15. BECKER E.L. - The relationship of the chemotactic behavior of the C. derived factors. C_3a - C_5a - C_{567} and a bacterial chemotactic factor for their ability to activate the proestrase of rabbit polymorphonuclear phagocytes.
- J. Exp. Méd., 1971, 135, 376-385.
16. BECKER E.L., DAVIES A.T., ESTENSEN B.D. - Cytochalasin B - IV inhibition and stimulation of chemotaxis of rabbit and human polynuclear leukocytes.
- Immunol., 1972, 108, 396-402.
17. BECKER E.L. - Enzyme activation and the mechanisms of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. The phagocytic cell in host resistance.
- Raven Press. N.Y., 1975, 1, 14.
18. BENDIXEN G., SOBORG M. - A leucocyte migration technique for in vitro detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in Man.
- Danish Medical Bulletin, 1969, 46, 1.
19. BERENBERG J.L., WARD P.A. - Chemotactic inactivator in normal human serum.
- J. Clin. Invest., 1973, 52, 1200-1206.
20. BESSIS M. - Cellules du sang normal et pathologique.
- Masson Edit. Paris, 1972.
21. BOGGS D.R., ATHENS J.W., HAAB O.P., RAAB S.O., CARTWRIGHT G.E., WINTROBE M.M. - Leukokinetic studies VIII. A search for an extramedullary tissue pool of neutrophilic granulocytes.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 115, 792-801.

22. BOGGS D.R. - The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease.
- Sem. Hemat., 1967, 4, 359-385.
23. BOKISH V.A., MULLER H.J., EBERHARD - Anaphylatoxin inactivator of human plasma : its isolation and characterization as a carbopeptidase.
- J. Clin. Invest., 1970, 49, 2427-2436.
24. BORDET P. - Immunologie - Collection médico-chirurgicale à révision périodique. Directeur PASTEUR VALLERY-RADOT et Jean HAMBURGER.
- Flammarion Edit., Médecine Sciences, Paris, 1976.
25. BOREL J.F. - Phénomènes biologiques du chimiotactisme.
- Nouvelle Revue d'Hématologie, 1974, 14, 231-246.
26. BOYDEN S. - The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes.
- J. Exp. Med., 1962, 115, 1, 453-466.
27. BRETON, GORIUS J., GUICHARD J. - Etude au microscope électronique de la localisation des peroxydases dans les cellules de la moelle osseuse humaine.
- Nouvelle Revue Franç. d'Hématologie, 1969, 9, 678.
28. BROXMEYER J., VAN ZAUT G., ZUCALI J.R., LOBUE J., GORDON A.S. - Mechanisms of leukocyte production and release. XII : A comparative assay of the leukocytosis - inducing factor (LIF) and the colony - stimulating factor (CSF).
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 145, 1262-1267.
29. BRYANT R.E., DESPREZ R., VAN WAY M. - Studies on human leukocyte motility.
- J. Exp. Med., 1966, 124, 483-499.
30. BRYANT R.E., SUTCLIFF M.C. - A method for quantation of human leukocyte adhesion to glass.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Hy., 1972, 141, 196.
31. BRYANT R.E., SUTCLIFF M.C. - The effect of 3.5.adenosine monophosphate on granulocyte adhesion.
- J. Clin. Invest., 1974, 54, 1241.
32. CARRAZ M. - I.N.A.P.H.A.R.M. - Pharmacologie de l'inflammation immunopharmacologie des affections rhumatismales.
- Nice, 19 octobre 1975.

33. CARTER S.B. - Haptotaxis and the mechanism of cell motility
- Nature 1967 , 213, 256-260.
34. CARTWRIGHT G.E., ATHENS J.W., WINTROBE M.M. - The Kinetics of granulopoiesis in normal man.
- Blood 1964, 24, 780-803.
35. CLARK R.A., KUMBALL H. - Defective granulocyte chemotaxis in the Higashi syndrome.
- J. Clin. Invest., 1971, 50, 2645-2652.
36. CLINE M.J. - Mechanism of acidification of the human leukocyte phagocytic vacuole.
- Clin. Res. 1973, 21, 595.
37. COCHRANE C.G., AIKIN B.S. - Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions, the destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro.
- J. Exp. Med., 1966, 124, 733-742.
38. COCHRANE C.G. - Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leukocytes.
- Advances Immunol. 1968, 9, 97.
39. COHN Z.A., MORSE S.I., - Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes. I. Observations on the requirement and consequence of particules ingestion.
- J. Exp. Med., 1960, 111, 667-687.
40. COHN Z.A., HIRSCH J.G. - The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule associated components of polymorphonuclear leucocytes.
J. Exp. Med., 1960, 112, 1015.
41. COPELAND D., STEWART T., HANIS J. - Effect of levamisole on in vitro human lymphocyte transformation.
- Cancer chemother. Rep., 1974, 58, 167-170.
42. CORBERAND J., DELARRARD B., DAMORON J. - Effet de l'aspirine - la migration spontanée des polynucléaires neutrophiles.
- Nouv. Presse Médicale, 1974, 2745.
43. CORNELLY H.P. - Reversal of chemotaxis in vitro and chemotactic activity of leucocyte fractions.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Méd., 1966, 122, 831-835.
44. CRONKITE E.P., FLIEDNER M.D. - Granulocytopenia.
- New Eng. J. Méd., 1964, 20, 1347.

45. CURNUTTE J.T., BABIOR B.M. - Biological depense mechanisms . The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes.
- J. Clin. Invest. 1974, 53, 1662.
46. CUTLER J.E. - A simple in vitro method for studies on chemotaxis.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 147, 471-474.
47. DE DUVE C., WATTIAUX R. - Functions of lysosomes.
- Ann. Rev. Physiol., 1966, 28, 435-460.
48. DELBARRE F., AMOR B., KAHAN A. - Phagocytose et inflammation.
- Symposium international sur l'inflammation et son traitement. Florence, Avril 1971.
Publié à Paris, 1972, Revue "R".
49. DELBARRE F. - Propriétés pro-inflammatoires des prostaglandines E et F.
- Rapport présenté au XXXX Congrès de Médecine-DAKAR 1-4 Décembre 1975.
Masson Edit. Paris, 1976.
50. DEMEO A.N., ANDERSEN B.R. - Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients.
- New Engl. J. Med. 1972, 286, 735-740.
51. DIAS DA SILVA W., EISELE J.W., LEPROW I.H. - Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement.
- J. Exp. Med., 1967, 125, 921.
52. DI ROSA M., PAPADIMITRIOU J.M., WILLOUGHBY D.A.- A histopathological and pharmacological analyses of the mode of action of non steroidal anti-inflammatory Drugs.
- J. Path., 1971, 105, 239-256.
53. DRESCH C., NAJEAN Y. - Cinétique des polynucléaires neutrophiles chez l'homme.
- Rev. Eur. Et. Clin. Biol., 1970, 15, 729-739.
54. DRESCH C., FAILLE A., RAIN J.D., NAJEAN Y. - Granulopoïèse : étude comparative de différentes méthodes de mesure de la production et de la richesse médullaire.
- Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1975, 15, 31-56.
55. DRESCH C., NAJEAN Y., BAUCHET J. - Kinetic studies of ^{51}Cr and DF^{32}P labelled granulocytes.
- Brit. J. Haemat., 1975, 29, 67-80.

56. DREVON M.C.- Pharmacochimie de quelques dérivés cyclo-
butaniques à propriétés anti-inflammatoires : Effets
sur la migration des leucocytes.
- Thèse Doctorat Etat Pharmacie LYON I, 30 Septembre
1976.
57. EDELSON P.J., STITES D.P. - GLOD S. - Disorders of neu-
trophil function. Defects in the early stages of the
phagocytic process.
- Clin. Exp. J., 1973, 13, 21-28.
58. ESTENSEN R.D., HILL H.R., QUIE P.G. - GMPC and cell
movement.
- Nature 1973, 245, 458-460.
59. EVREUX J.C. - Métabolisme de l'aspirine.
- Cahiers médicaux, 1975, 1, 1.
60. FAUVE R.M. - Immunité non spécifique.
- Flammarion Sciences J.F. BACH Immunol., 1976, 15, 372-387.
61. FEDORKO M.E. - HIRSCH J.G. - Cytoplasmic granule for-
mation in myelocytes. An electron microscope radio
autographic study on the mechanism of formation of
cytoplasmic granules in rabbit heterophil myelocytes.
- J. Cell. Biol. 1966, 29, 307.
62. FREED J., BISHEY A.M., LEBOWITZ M.M. - The relation of
microtubules and microfilaments to the mobility of
cultured cells.
- J. Cell. Biol., 1968, 39, 46a-47a.
63. FREI P.C., BAISERO M.H., OCHSNER M. - Chemotaxis of human
polymorphonuclears in vitro § II - Technical study.
- J. Immunol.Methods, 1974, 375, 386.
64. FREI J., AELLIG A., NESSI P. - Systèmes enzymatiques et
coenzymes impliqués dans le métabolisme du polynuclé-
aire neutrophile.
- Ann. Biol. clin. 1975, 33, 459-464.
65. GADER A.M.A., CAST J.D. - The effect of adrenaline nora-
dreñaline, isoprenaline and solbutamol on the resting
levels of white blood cells in man.
- Scand. J. Haemat., 1975, 14, 5-10.
66. GAIL M.H., BOONE CH. W. - Dissociation of cell motility
from cell proliferation in BALB/C - 3T3 fibro-
blasts.
- Exp. Cell. Research., 1972, 70, 2, 439-447.

67. GALBRAITH P.R. - Studies on control of granulopoiesis in man. II. Influence of circulating neutrophil count on release of labelled bone marrow cells.
- Canad. Med. Ass. J., 1974, 111, 919-923.
68. GALLAIS H., HAYOUN B., CASANOVA P. - Les antiinflammatoires.
- Méditerranée Méd., 81, 45-68.
69. GALLIN J., CLARK R., KIMBALL H. - Granulocyte chemotaxis : an improved in vitro assay employing ⁵¹CR labelled granulocytes.
- J. Immunol., 1973, 110-1-, 233-240.
70. GALLIN J.I., ROSENTHAL A.S. - The regulatory role of divalent cations on human granulocyte chemotaxis.
- J. Cell. Biol., 1974, 62, 594.
71. GALLIN J.I., DUROCHER J.R., KAPLAN A.P. - Intereaction of leukocyte chemotactic factors with the cell surface. I. chemotactic factor induced changes in human granulocyte surface charge.
- J. Clin. Invest. 1975, 55, 967-974.
72. GALLIN J.I. - Abnormal chemotaxis : cellular and humoral components.
- The phagocytic cell and host resistance, 1975, Raven Press. N.Y.
73. GALLIN J.I., WOLFF S.M. - Leucocyte chemotaxis : physiological considerations.
- Clinics in haemat. and monocytes abnormalities, 1975, 4 n° 3, 567-607.
74. GAMOW E., BARNES F.S. - Chemotactic responses of human polymorphonuclear leukocytes to OMPC and other compounds
- Exp. cell. Res., 1974, 87, 1-7.
75. GARVIN H. - Factors affecting the adhesiveness of human leukocytes and platelets in vitro.
- J. Exp. Med., 1961, 114, 51-73.
76. GEORGE M., VAUGHAN J.H. - In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 111, 514-521.
77. GEORGE M., WEED R.I., REED C. - adhesion of human erythrocytes to glass : the nature of the interaction and the effect of serum and plasma.
J. Cell. Physiol., 1971, 77, 51.
78. GIGANTE D., CRESPI M., TACCARI E. - Les mastocytes dans l'inflammation.
- Symposium international sur l'inflammation et son traitement. Florence Avril 1971 publié à Paris 1972 Revue "R"

79. GILLEPSIE E. - Colchicin binding in tissue slices, decrease by calcium and biphasic effect of adenosine . 3. 5 monophosphate.
- J. Cell. Biol., 1971, 50, 544.
80. GIORDANO G.F., LICHTMAN M.A. - Marrow cell egress. The central interaction of barrier pore size and cell maturation.
- J. Clin. Invest. 1973, 52, 1154-1164.
81. GOETZL E., WASSERMAN I.G.S., AUSTEN K. - Aneutrophil immobilizing factor derived from human leucocytes.
- J. Immunol. 1973, 111, 938-945.
82. GOETZL E., AUSTEN K. - Stimulation of human neutrophil leukocyte aerobic glucose metabolism by purified chemotactic factors.
J. Clin. Invest, 1974, 53, 591-599.
83. GOWLAND E. - Studies on the emmigration of polymorphonuclear leucocytes from skin lesions in man.
- J. Path. Bact., 1964, 87, 347.
84. GRAHAM R.C., HEBERT R.H., RATNOFF O.D. - Pathogenesis of inflammation II in vivo observation of the inflammatory effects of hageman factor and bradykinin.
- J. Exp. Med., 1965, 121, 807.
85. HALPERN B.N. - Inhibition of the local shwartzman reaction by a polypeptide possessing potent antiprotease activity.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 115, 273.
86. HART F.D. - Clinical experience with aspirine and indomethacin in rheumatoid arthritis. Potential significance of prostaglandine and their blockade.
- In prostaglandine synthetase inhibitors edited by ROBINSON H.J. and VANE RAVEN Press, New York 1974.
87. HAYOUN B., GALLAIS H., ROUX H. - L'inflammation et ses mécanismes.
- Méditerranée Médicale, 1975, 81, 11-42.
88. HENSON P.M., COCHRANE C.G. - Immunological induction of increased vascular permeability. II. Two mechanisms of histamine release from rabbit platelets involving complement.
- J. Exp. Med., 1969, 129, 167.

89. HILL H.R., DODIS H., QUIE P.G. - Defect in neutrophil granulocyte by neutrophil granulocytes in job's syndrome.
- Lancet, 1974, 617-619
90. HILL H.R., HOGAN, N.A., MITCHELL T.G., QUIE P.G. - Evaluation of a cytocentrifuge method for measuring neutrophil granulocyte chemotaxis.
- J. Lab. Clin. Med., 1975, 86, 4, 703-710.
91. HILL H.R., ESTENSEN R.D., QUIE P.G. - Modulation of human neutrophil chemotactic responses by cyclic - 3' 5' guanosine monophosphate.
- Metabolism, 1975, 24, 447-456.
92. HIRSH J.G. - Phagocytin : A bactéricidal substance from polymorphonuclear leukocytes.
- J. Exp. Med., 1956, 103, 613. Cité par SOUILLET (198)
93. HUNNINGHAKE G.W., FAUCI A.S. - Quantitative and qualitative effects of cyclophosphamide and administration on circulating polymorphonuclear leucocytes.
- Immunology, 1976, 31, 139-144.
94. HURLEY J.V. - Substances promoting leukocyte émigration
- Ann. NY Acad. Sci., 1964, 116, 2918.
95. IGNARRO L.J., LINT T.F., GEURGE W.J. - Hormonal control of lysosomal enzyme release form human neutrophils. Effects of autonomic agents on enzyme release phagocytoses, and cyclic nucléotide levels.
- J. Exp. Med., 1974, 139, 1395-1414.
96. ISHIZAKA K., ISHIZAKA T. - Biologic function of antibodies and mechanisms of reaginic hypersensibility.
- Clin. Exp. Immunol., 1970, 6, 25-39.
97. JANOFF A. - Mediators of tissue damage in human polymorphonuclear neutrophils.
- Sem. Haemat., 1970, 111, 196-130.
98. JAUSA P.) Skin window in clinical routine.
- Folia Haemat., 1973, 99, 121.
99. JOHNSON R.E. - Drugs and phagocytes.
- The new Eng. J. Med., 1974, 28, 1187-1188.
100. KAPLAN A.P. - KAY A.B. - AUSTEN K.F. - A prealbumin activator of prekallikrein III. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein.
- J. Exp. Med., 1972, 135, 81-97.

101. KELLER H.U. - Studies on chemotaxis -III- Modification of Boyden's technique for the evaluation of chemotaxis agents.
- Immunology, 1966, 10, 225.
102. KELLER H.U., SORKIN E. - Studies on chemotaxis - IV - the influence of serum factors on granulocyte locomotion.
- Immunology, 1966, 10, 409-416.
103. KELLER H.U. - SORKIN E. - Studies on chemotaxis VI - Specific chemotaxis in rabbit polymorphonuclear leucocytes and mononuclear cells.
- Int. Arch. Allergy, 1967, 31, 575.
104. KELLER H.U., SORKIN E. - Studies on chemotaxis XIII. Differences in the chemotactic response of neutrophil and eosinophil polymorphonuclear leucocytes.
Int. Arch. Allergy, 1969, 35, 279.
105. KELLER H.U. - Chemotaxis and its significance for leucocyte accumulation.
- Agents and actions, 1972, 2, 4, 161-169.
106. KELLER H.U., BOREL J.F., WILKINSON P.C. - Re-assessment of Boyden's technique for measuring chemotaxis.
- J.Immunol.Methods 1972, 165, 168.
107. KELLER H.U., HESS, M.W., COTTIER H. - The in vitro assessment of leucocyte chemotaxis.
- Antibiotics and chemotherapy, 1974, 19, 112-125.
108. KELLER H.U.; HESS M.W., COTTIER H. - Physiology of chemotaxis and random mobility.
- Neutrophil physiology and pathology, 1975, Gume et Shaton Ed., 45-67.
109. KELLER H.U., HESS M.W., COTTIER H. - Chimiotaxie du polynucléaire neutrophile.
- Rev. Med., 1976, 38, 8 Novembre 2059-2068.
110. KETCHEL M., FAVOUR C.B. - The acceleration and inhibition of human leukocytes in vitro by plasma protein fraction.
-J.Exp. Med., 1955, 101, 647.
111. KJOSEN B., BASSOE H.H., SOLBERG C.O. - Influence of phenyl butazone on leukocyte glucose metabolism and function.
- J.of the Reticulo. Soc., 1976, 20, 6, 447-455.
112. KLEBANOFF J.J. - Intraleukocytic microbicidal defects;
- Ann. rev. Med., 1971, 22, 39.

113. KLEBANOFF J.J. - Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes.
- Sem. Hémat., 1975, 12, 117-142.
114. LACHMAN P.J., MULLER-EBERHARD H.J. - The demonstration in human serum of "conglutininogen-activator factor" and its effects on the third component of complement.
- Immunology, 1968, 100, 691-698.
115. LAWRENCE D.A., WAIGLE W.O., SPEIGELBERG H.L. - Immunoglobulines cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils.
- J. Clin. Invest., 1975, 55, 368-376.
116. LICHTMAN M.A., WEED R.I. - Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation : relationship to cell function.
- Blood, 1972, 39, 301-316.
117. LOMNITZER R., RALSON A., KOORNHOF H. - The effects of CAMP on leukocyte in inhibitory factor (LIF) production and the inhibition of leukocyte migration.
- Clin. Exp. Immunol., 1976, 24, 42-48.
118. LOMNITZER R., RALSON A., KOORNHOF J. - Leukocyte capillary migration : on adherence dependant phenomenon.
- Clin. Exp. Immunol., 1976, 25, 303-310.
119. MAC CALL C.E., CAVES J., COOPER R. - Functional characteristics of human toxic neutrophils.
- J. Infect. Diseases, 1971, 124, 1, 68-75.
120. MAC CUTCHEON M. - Chemotaxis in leukocytes.
- Physiol. Rev., 1946, 26, 319, 336.
121. MAC GREGOR, R.R., SPAGNUOLO P.J., LEUTREK A.L. - Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin measured with an assay system.
- New Engl. J. Med., 291, 642-646.
122. MAC LEOD D.L., SHREEVE M.M., AXELRAD A.A. - Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro : quantitative assay method for CFU-E.
- Blood, 1974, 44, 517-534.
123. MALAWISTA S.E. - Colchicine : a common mechanism for its anti-inflammatory and anti-mitotic effects.
- Arthr. and Rheum., 1968, 11, 191-212.
124. MALAWISTA S.E. - Microtubules and the mobilization of lysosomes in phagocytizing human leukocytes.
- Ann. N.Y. Acad. Sc., 1975, 253, 738-749.

125. MARCHAL G. - Mesure par une microméthode de l'activité chimiotactique pour les macrophages des surnageants de lymphocytes murins stimulés par la concanavaline A.
- Ann. Sci.I.P., 1975, 126 C, 615-620.
126. MARGIT SURJAN - Biochemistry and biological activity of the complement system.
- Report delivered at the meeting of the hungarian Society of Immunology, Budapest, November, 1972, 7-8, 101-115.
127. MASS M.F., DEAN P.B., WESTON W.L. - Leukocyte migration in vivo : a new method of study.
- J. Lab. Clin. Med. - cité par J.R. HUMBERT, Miesch., 1975.
128. MASSOUD A. - Contribution à l'étude du test de migration leucocytaire.
- Thèse Doct. Etat Pharm., Lyon I, 21 juin 1974.
129. MENKES C.J. - Comment choisir un anti-inflammatoire en rhumatologie.
- La Nouv. Presse Méd., 28 juin 1975, 4, 26 I 1929-1931.
130. METCALF D., PARKER J., CHESTER H.M., KINCADE P.W. - Formation of eosinophilic like granulocytic colonies by mouse bone marrow cells in vitro.
- J. Cell Physiol., 1974, 84, 275-290.
131. METCALF D., MAC DONALD H.R., ODARTCHENKO N., SORDAT B. - Growth of mouse megacaryocyte colonies in vitro.
- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, 72, 1744-1748.
132. MIGNE J. - Biochimie de l'inflammation, les systèmes phlogogènes.
- Symposium international sur l'inflammation et son traitement. Florence, avril 1971, publié à Paris, avril 1972.
133. MILLER M.E. - Leukocyte movement : in vitro and in vivo correlates.
- J. Pediat., 1973, 83, 1104-1106.
134. MILLER M.E., NELSON U.R. - A familial deficiency of the phagocytosis enhancing activity of serum related to a dysfunction of C5.
- New Engl. J. Med., 1970, 282, 354-358.
135. MILLER M.E., OSKI F.A., HARRIS H.B. - Lazy leukocyte syndrome.
- Lancet, 1971, L, 665-669

136. MILLER M.E. - Pathology of chemotaxis and random mobility.
- Neutrophil physiology and pathology, a seminary in
hematology reprint.
Humber, Miescher. Ed., 1975.
137. MILLER M.E. - Cell movement and host defenses.
- Clin. Intern. Med., 1973, 78, 601-603.
138. MILLER M.E. - Chemotaxis and random mobility clinical
and biologic differentiation.
- Antibiotics and chemotherapy, 1974, 19, 338-349.
139. MILLER M.E., NORMAN M.E., KOBLENZER P.J. - A new familial
defect of neutrophil movement.
- J. Lab. Clin. Med., 1973, 82, 1-8.
140. MOORE M.A.S., WILLIAMS N., METCALF D. - Purification and
characterization of the in vitro colony forming cells
in monkey hemopoietic tissue.
- J. Cell Physiol., 1972, 79, 282-292.
141. MOWATT A.J., BAUM J. - Chemotaxis of polymorphonuclear
leukocytes from patients with diabetes mellitus.
- New Engl. J. Med., 1971, 284, 621-627.
142. MULLER-EBERHAR H.J. - Complement and phagocytosis.
- The Phagocytic Cell in Host resistance, edited by
J. BELLAN, RAVEN Press. N.Y., 1975, 87-98.
143. NAIDU T.G., NEWBOULD F.H. - A simple method for quanti-
tation of chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils
in vitro.
- Immunol. Commun., 1974, 3/5, 455-463.
144. NAJJAR V.A., NISHIOKA K., "Tuftsin" : a physiological
phagocytosis stimulating peptide.
- Nature, 1970, 228, 672.
145. NELSON R.V., FIEGEL D.V., SIMMONS R.L. - Chemotaxis of
human polymorphonuclear neutrophil under agarose
morphologic changes associated with the chemotactic
response.
- J. Immunol., 1976, 117, 5, 1676-1683.
146. NELSON R.V., QUIE P., SININENS R. - Chemotaxis under
agarose : a new and simple method for measuring che-
motaxis and spent anears migration of human polymor-
phonuclear leukocytes and monocytes.
- J. Immunol., 1975, 115, 6, 1650-1656.

147. NISHUIRA M., YAMANOTOS S., HAYASKI H. - The natural mediator for PMN emigration in inflammation VI. Production of leucoegresin by inflammation SH-dépendant protease in active Arthus reactions in C-depleted rabbits.
- Immunology, 1974, 27, 1023-1031.
148. ORANGE R.P., AUSTEN K.F. - Chemical mediators of immediate hypersensitivity.
- Immunol. Biol. Ed. GOOD R.A., FISHER D.W., STAMFORD (Connecticut), 1971, 305 p, 115-121. Cité par Migne (132).
149. PANTALONE R.M., PAGE R.C. - Lymphokine - induced production and release of lysosomal enzymes by macrophages.
- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, 72, 6, 2091-2094.
150. PATTERN E., GALLIN J.I., CLARK R.A. - Effects of cell concentration and various anticoagulants on neutrophil migration.
- Blood, 1973, 41, 711-719.
151. PEKAREK J., SVEJCAR J., NOUZA K., HOHANOVSKY J. - Effect of immunosuppressive drugs on an in vitro correlate of cell mediated immunity.
- Immunology, 1976, 31, 773-779.
152. PELTIER A. - Le rôle du complément dans l'inflammation.
- Symposium international sur l'inflammation et son traitement. Florence Avril 1971, publié à Paris 1972, Revue "R".
153. PELTIER A. - L'opsonisation.
- Nouv. Rev. Franç. Hémat., 1974, 4, 247-257.
154. PELTIER A. - Le complément.
- Chapitre 8 p. 202 dans BACH (J.F.). Immunologie. Flammarion Médecine Sciences, Paris 1976.
155. PETERS W.P., HOLLAND J.F., SEUN H. - Corticoïd administration and localized leukocyte movement in man.
- New Eng. J. Med., 1972, 342-345.
156. PHELPS P., MAC CARTY D.J. - Suppressive effects of indomethacin on crystal induced inflammation in canine joints and on neutrophilic motivity in vitro.
- J. Pharmacol. Exp. Ther. , 1967, 58, 3, 546-553.
157. PHELPS P. - Polymorphonuclear leukocyte mobility in vitro III. Possible release of a chemotactic substance of phagocytosis of urate crystals by polymorphonuclear leukocytes.
- Arth. Rheum., 1969, 12, 197.

158. QUIE P.G., MESSNER R.P., WILLIAMS R.C. - Phagocytosis in subacute bacterial endocarditis localization of the primary opsonic to FC fragment.
- J. Exp. Méd., 1968, 128, 553.
159. RABINOVITCH M. - Phagocytosis: the engulfment stage.
- Sem. Hémat., 1968, 5, 134.
160. RABINOWITZ Y. - Séparation of lymphocytes polymorphonuclear leukocytes and monocytes in glass columns, including tissue culture observations.
- Blood, 1964, 23, 811-828.
161. RAMSEY W.S. - Analysis of individual leucocyte behavior during chemotaxis.
- Exp. Cell Res., 1972, 70, 129-139.
162. RAMSEY W.S. - Retraction fibers and leucocytes chemotaxis.
- Exp. cell. Res., 1974, 86, 184-187.
163. REAVEN E.P., AXLINE S.G. - Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting and phagocytosing cultivated macrophages.
- J. Cell. Biol., 1973, 59, 12.
164. REBUCK J., GROWLEY J. - A method for studying leukocytic function in vivo.
- Amer. N.Y. Acad. Sc., 1955, 59, 757.
165. REGAMEY A. - Chimiotactisme des polynucléaires humains in vitro.
- Ann.Immunol.I.P., 1973, 124 C, 493-509.
166. RENOUX G., RENOUX M. - Influences du lévamisole sur l'induction immunologique des lymphocytes T.
- Ann.Immunol.I.P., 1975, 126 C, 91.
167. RICHENS E., BROWN K.A., COLLISN A.J., BACON P.A. - Circadian rythms in cell migration in vitro, and its effect on antigen induced migration inhibition.
- Clin. Exp.Immunol., 1975, 19, 343-346.
168. RIFFAT G.V. - Que peut-on attendre de la thérapeutique par inhibiteur d'enzymes en rhumatologie.
- Entretiens de Bichat - Thérapeutique, 1971, 296-298.
169. RIVKIN I., ROSENBLATT J., BECKER E.L. - The role of AMPc in the chemotactic responsiveness and spontaneous motility of rabbit peritoneal neutrophils
- Immunology, 1975, 115, 1126-1134.

170. ROBINEAUX R., BONA C. - Phagocytose et Pinocytose.
_ BORDET Immunol., 1976, 155-207 - Flammarion Sciences.
171. ROBINSON D.R., LEVINE L. - Prostaglandin concentration in synovial fluid in rheumatic diseases : action of indomethacin and aspirin.
- In prostaglandin synthetase inhibitors edited by ROBINSON H.J. and VANE, RAVEN Press, N.Y., 1974.
172. ROBINSON W.A., MANGALIK A. - The kinetics and regulation of granulopoiesis.
- Sem. Hémat., 1975, 12, 7-25.
173. ROCKLIN R.E. - Products of activated lymphocytes : leucocytes inhibitory factor (LIF) distinct from MIF
-Immunology, 1974, 112, 1461.
174. ROSENBERG S.A., DAVID J.R. - Inhibition of leukocyte migration : an evaluation of this in vitro assay of delayed hypersensitivity in man to a soluble antigen.
- J. Immunol, 1970, 105, 6, 1447-1452.
175. ROTHER K. - Leukocytes mobilizing factor : a new biological activity derived from the third component of complement.
- Europ. J.Immunol.1972, 2, 550-558.
176. RUDDY S., IRMAGIGLI M.D., FRANK K., AUSTEN K.F. - The complement system of man (fourth of four parts).
- New Eng. J. Med., 1972, 287, 13, 642-646.
177. RUDDY S., AUSTEN K.F. - Activation of the complement system in rheumatoid synovitis.
- Fed. proc.,1973, 32, 2, 134-137.
178. RYDGREN L., SIMMURSKOLD G., BANDMANN U. - The role of cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocyte chemotaxis.
- Exp. Cell Res., 1976, 99, 207-220.
179. SAARI T.N., HUMBERT J.R., WESTEN W.L. - A new syndrome resembling chronic granulomatous disease associated with defects of neutrophil movement.
- Clin. Res., 1975, 23, 152 A.
180. SAMPSON D., LUI A. - The effect of levamisole on cell mediated immunity and suppressor cell function.
- Cancer Res., 1976, 36, 952-955.

181. SCHMIDT M.E., DOUGLAS S.D. - Effects of levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors.
- Clin. Immunol. Immunopathol., 1976, 6, 299-305.
182. SCHULTZ J., CORLIN R., ODD F. - Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. III. Isolation of the peroxidase granule.
- Arch. Biochem., 1965, 111, 73.
183. SCHWARTZ D. - Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.
- Flammarion Médecine-Sciences, 1974, 3ème édition.
184. SENDA M., TAMURA H., SLUBATA M. - The mechanism of the movement of leukocytes.
- Exp. Cell Res., 1975, 91, 393-407.
185. SENN H.J., JUNGI W.F. - Neutrophil migration in health and disease.
- Neutrophil Physiology and Pathology, Grune - Stratton N.Y., 1975.
186. SENN H.J., HOLLAND J.F. - Leukocyte mobilization in health and acute leukemia.
- Blood, 1967, 30, 888.
187. SENN H.J., HOLLAND J.F., BANEYU T. - Kinetic and comparative studies of localized leucocyte mobilization in normal man.
- J. Lab. Clin. Med., 1969, 74, 742-756.
188. SENN H.J., HOLLAND J.F., - Plastic skin chamber technique for comparative studies on localized leukocyte mobilization in man.
- Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. , 1969, XIV, 373-377.
189. SEZE S. de, SORIA C., GUERIN B. - Les facteurs de la coagulation dans l'inflammation. - Symposium intern. sur l'inflammation et son traitement. Avril 1971.
- Publié à Paris, 1972, Revue "R".
190. SHIBATA N. , TATSUMI N., TONAKA K. - Leucocyte myosin and its location en the cell.
- Bioch. Bioph. Acta., 1975, 400, 222, 243.
191. SHOWELL H.J., BECKER E.L. - The effects of external K^+ and Na^+ on the chemotaxis of rabbit peritoneal neutrophils.
- Immunology, 1976, 116, 99.

192. SIEGEL S. - Non parametric statistics for the behaviour sciences.
- Gray Hill M.C. Book, company, N.Y., Toronto-London.
193. SKARNES R.C. - L-amino-acid oxidase, a bactericidal system.
- Nature, 1970, 225, 1072.
194. SMITH F.W., BARWETT J.A., MAY R.P., SANFORD J.P. -
Comparison of the opsonic activity of gamma G
and gamma M anti-protein globulins.
-Immunology, 1967, 98, 336.
195. SOBORG M., BENDIXEN G. - Human lymphocyte migration as
a parameter of hypersensibility.
- Acta Med. Scand., 1967, 181, 247.
196. SOLBERG C.O. - Influence of phenybutazone on the phago-
cytic and bactericidal activities of neutrophil
granulocytes.
- Acta Path. Microb. Scand., B, 1974, 82, 258-263.
197. SOLBERG C.O. - Influence of therapeutic concentrations
of phenyl-butazone on granulocyte function.
- Acta Path. Microb. Scand. Sect. B, 1975, 83, 100-102.
198. SOUILLET G. - Phagocytose et bactéricidie.
- Thèse Médecine, 1972, Lyon.
199. SPITLER L.E., SPATH P., PETZ L. - Phagocytes and C₄ in
paraproteinaemia.
- Brit. J. Haemat., 1975, 29, 279-292.
200. SPOONER B.S., YAMADA K.M., WESSELS N.K. - Microfilaments
and cell locomotion.
- J. Cell Biol., 1971, 49, 595-613.
201. STEVENSON R.D. - Hydrocortisone and the migration of
human leukocytes : an indirect effect mediated by
mononuclear cells.
- Clin. Exp. Immunol., 1973, 14, 417.
202. STEVENSON R.D. - Studies on the production and action
of polymorph migration stimulator.
- Clin. Exp. Immunol., 1976, 24, 527-533.
203. STECHEL V.J., LIAUW L., CHINIA G. - Effects of levamisole
on adherence and chemotaxis of leukocytes.
- Fed. Proc., 1976, 35, 531.

204. STOHLMAN F., QUESENBERRY P.J., TYLER W.S. - The regulation of myelopoiesis as approached with in vivo and in vitro techniques.
- Progr. Hémat., 1973, 8, 259-297.
205. STOLC V. - Restaired adenylcyclase in human neutrophils : stimulation of cyclic adenosine 3', 5' monophosphate formation and adenylcyclase activity by phagocytosis and prostaglandins.
- Blood, 1974, 43, 743,-748.
206. STORTI E., LUSVARGHI E., GRIGANFFINI G.F., SGANDURRA A. Biological and clinical significance of the adrenaline test in haematology.
- Haematologia, 1967, 1, 27-34.
207. STOSSEL T.P., MASON R.J., HARTWIN G.J., VAUGHAM M. - Quantitative studies of phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes : use of emulsions to measure the initial rate of phagocytosis.
- J. Clin. invest., 1972, 51, 615-624.
208. STOSSEL T.P. - On the mechanism of action of heat labile (HLD) and heat-stable (HSD) opsonins.
- Blood, 1972, 40, 969.
209. STOSSEL T.P. - Quantitative studies of phagocytosis. Kinetic effects of cations and heat-labile opsonin.
- J. Cell. Biol., 1973, 58, 346-356.
210. STOSSEL T.P., POLLARD T.D. - Myosin in polymorphonuclear leukocytes.
- J. Biol. Chem., 1973, 248, 8288.
211. STOSSEL T.P. - Phagocytosis.
- New Engl. J. Med., 1974, 290, 774.
212. STOSSEL T.P. - Phagocytosis (three parts).
- New Engl. J. Med., 1974, 290, 717, 774, 833.
213. STOSSEL T.P. - Phagocytosis : recognition and ingestion
- Sem. Hémat., 1975, 12, 83-116.
214. STOSSEL T.P., HARWIG J.H. - Interactions between actin myosin and an actin-binding protein rabbit alveolar macrophages.
- J. Biol. Chem., 1975, 250, 5706.

215. STRECHER V.J., SORKIN E., RYAN G.B. - Relation between blood coagulation and chemotaxis of leukocytes.
- Nature, 1971, 233, 95-96.
216. SULLIVAN T.J., PARKER K.L., EISEN S.A., PARKER C.W. - Modulation of cyclic AMP in purified rat mas cells.
II : Studies on the relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and histamine release
-Immunology 1975, 114, 5, 1480-1485.
217. SYMOENS J. - Le lévamisole, une chimiothérapeutique antianergique.
- Louvain Méd., 1976, 95, 383, 395.
218. TILL J.E., MAC CULLOGH E.A. - A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.
- Radiat. Res., 1961, 14, 213.
219. TILL G., WARD P. - Two distinct chemotactic factor inactivators in human serum.
-Immunology, 1975, 114, 843-847.
220. TSE R.L., PHELIPS P., URBAN D. - Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. VI : Effect of purin and pyrimidin analogues : possible role of AMPc.
- J. Lab. Clin. Med., 1972, 80, 264-274.
221. TYALOR F.B., WARD P.A. - Generation of chemotactic activity in rabbit serum by plasminogen) streptokinase mixtures.
- J. Exp. Med., 1967, 126, 149-158.
222. VANARMAN CG., CARLSON R.P., BROWN W.R., ITKIN A. - Indomycin inhibits the local schwartzman reaction.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1970, 134, 163-168.
223. VANE J.R. - Mode of action of aspirin and similar compounds
- In prostaglandin synthetase inhibitors, edited by ROBINSON H.J. and VANE J.R., Raven Press, N.Y., 1974.
224. VAN EPPS D.E. , ANDERSEN B.R.- Streptolysin O inhibition of neutrophil chemotaxis and mobility : non immune phenomenon with species specificity.
- Infect.
225. VARGUES R. - Réactions inflammatoires.
- Immunol. Clin., 1973.
226. VERSIJP G., VAN ZWET T., VAN FURTH R. - Levamisole and function of peritoneal macrophages.
- Lancet, 1975, 1, 798.

227. VIKEN K.E. - Effect of sodium - Salicylate on the functions of cultured, human mononuclear cells.
- Acta. Path. Microb. Scand. Sect. C, 1976, 84, 465-470.
228. WARD P.A. , BERENBERG J.L. - Defective regulation of inflammatory mediators in Hodgkin's disease - Supernormal levels of chemotactic factor inactivator.
- New Engl. J. Med., 1974, 290, 76-80.
229. WARD P.A., SCHLEGEL R.J. - Impaired leukotactic responsiveness in a child with recurrent infections.
- Lancet, 1969 , 2 , 344-347.
230. WARD P.A. - Leukotaxis and leukotactic disorders.
- Am. J. of Path., 1974, 77, 520-538.
231. WARD P.A., COCHRANE C.G., MULLER-EBERHARD - Further studies on the chemotactic factor of complement and its formation in vivo.
- Science 1969, 163, 1079.
232. WARD P.A., BECKER E.L.- Biochemical demonstration of the activable esterase of the rabbit neutrophil involved in chemotactic response.
- J. Immunol. 1970, 105, 5, 1057-1067.
233. WARD P.A., BECKER E.L. - Potassium reversible inhibition of chemotaxis by ouabain.
- Life Sci. 1970, 9, 335-360.
234. WARD P.A., BECKER E.L. - Mechanisms of the inhibition of chemotaxis by phosphonate esters.
- J. Exp. Med. 1967, 125, 1001, 1020.
235. WARD P.A. - Complement derived leukotactic factors in pathological fluids.
- J. Exp. Med. 1971, 134, 1095.
236. WARD P.A. , COCHRANE C.G., MULLER- EBERHARD H.J. - Further studies on the chemotactic factor of complement and its formation in vivo.
- Immunology, 1966, 11, 141-153.
237. WARD P.A. - BECKER E.L. - The deactivation of rabbit neutrophils by chemotactic factor and the nature of activable esterase.
- J. Exp. Méd., 1968, 127, 693-709.
238. WEISS A.P. , GALLIN J.I., KAPLAN A.P. - Fletcher factor deficiency : a diminished rate of Hageman factor inactivation caused by absence of prekallikrein with abnormalities of coagulation, fibrinolysis, chemotactic activity and kinin generation
- J. of Clin. Invest., 1974, 53, 622-633

239. WEISSMANN, ZURIER R.B., PFIELER P., GOLDSTEIN I. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocyte exposed to immune complexes and other particles.
- J. Exp. Med., 1971, 134, 1495-1655.
240. WEISSMANN G. ZURIER R.R., HOFFSTEIN S. - Leukocytic proteases and the immunologic release of lysosomal enzymes.
- Amer. J. Path., 1972, 68, 533.
241. WESSELS N.K., SPOONER B.S., BRADLEY M.O. - Microfilaments in cellular and developmental processes : contractile microfilament machinery of many cell type is reversibility inhibited by cytochalasin B.
- Sci., 1971, 171, 135.
242. WESSEREAU A. - Méthodes statistiques en Biologie et en Agronomie.
- Libr. J.B. Baillierie et Fils, Paris, 1960.
243. WETZEL B.K., HORN R.G., SPILER S.S. - Fine structural studies on the development of heterophil, eosinophil and basophil granulocytes in rabbits.
- Lab. Invest., 1967, 16, 349.
244. WHITEHOUSE M.V.I. - The molecular pharmacology of anti-inflammatory drugs : some possible mechanisms of action at the biochemical level.
- Biochem. Pharmacol. Suppl., 1968, 293.
245. WINTER Ch. A. - Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- Symposium international sur l'inflammation et son traitement. Florence, avril 1971, publié à Paris, 1972, Revue "R".
246. WISSLER J.H., STECHER V.J., SORKEN E. - Biochemistry and biology of a leukotactic binary peptide system related to anaphylatoxin.
- Int. Arch. Allergy, 1972, 42, 722-747.
247. WILKINSON P.C., BOREL J.F., STECKER V.J. - Macrophage and neutrophil specific chemotactic factors in serum.
- Nature, 1969, 222, 244.
248. WILKINSON P.C., MAC KAY I.C. - Recognition in leukocyte chemotaxis. Antibiotics and chemotherapy.
- Karger Ed., Bâle, 1974, 19, 421-441.
249. WILKINSON P.C. - Surface and cells membrane activities of leukocyte chemotactic factors.
- Nature, 1974, 251, 58-60.

250. WILKINSON P.C. - Inhibition of leukocyte locomotion and chemotaxis by lipid. Specific bacterial toxins.
- Nature, 1975, 255, 485-487.
251. WILKINSON P.C. - Recognition and response in mononuclear and granular phagocytes.
- Clin. Exp. Immunol., 1976, 25, 355-366.
252. WOODIN A.M., WIENEKE A.A. - Action of DFP on the leukocyte and the axon.
- Nature, 1970, 227, 460.
253. YOSHINAGA M., YAMAMOTO J., KIYOTA S., HAYASHI H. - The natural mediator for PMN Emigration in inflammation. IV : In vitro production of a chemotactic factor by papain from immunoglobulin G.
- Immunology, 1972, 22, 393.
254. ZEYA H.I., SPITZNAGEL J.K. - Cationic protein - bearing granules of polymorphonuclear leukocytes.
- Sci. 1969, 163, 1069-1075.
255. ZEYA H.I., SPITZNAGEL J.K. - Characterization of cationic protein bearing granules of polymorphonuclear leukocytes.
- J. Lab. Invest., 1971, 24, 229.
256. ZIGMOND S.H., HIRSCH J.C.) Cytochalasim B : inhibition of D₂ deoxy glucose transport into leukocytes and fibroblasts.
- Sci. 1972, 176, 1432-1434.
257. ZIGMOND S.H., HIRSCH J.C. - Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor.
- J. Exp. Med., 1973, 137, 387-410.
258. ZIGMOND S.H. - Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes.
- Nature, 1974, 249, 450-452.
259. ZURIER - Suppression of adjuvant arthritis.
- Arthr. Rheum., 1973, 16, 251-258.
260. ZURIER R.B., WEISSMANN G., HOFFSTEIN S., KAMMERMAN S., TAI A.H. - Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II : Effects of CAMP and cGMP. Autonomic agonists and agents which affect microtubule function.
- J. Clin. Invest., 1974, 53, 297-309.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
PLAN.....	2
PREMIERE PARTIE :	
ETUDE DU POLYNUCLEAIRE ET DE SA PARTICIPATION AUX MECANISMES DE L'INFLAMMATION.....	3
1. LE POLYNUCLEAIRE.....	5
1.1. Origine.....	5
1.1.1. Généralités.....	5
1.1.2. Maturation des polynucléaires...	5
1.1.3. Cinétique de la maturation.....	6
1.1.4. Mécanisme de régulation de la granulopoïèse.....	9
1.1.5. Méthodes d'étude de la granulo- poïèse.....	11
1.2. MORPHOLOGIE.....	12
1.2.1. Etude morphologique du polynu- cléaire neutrophile normal.....	12
1.2.2. Etude morphologique de la lignée granuleuse et maturation de ses granulations.....	13
1.2.3. Etude morphologique des granulo- cytes éosinophiles.....	17
1.2.4. Etude morphologique des granulo- cytes basophiles.....	17
1.3. STRUCTURE CHIMIQUE ET CARACTERISTIQUES METABOLIQUES DES POLYNUCLEAIRES.....	18

	<u>Pages</u>
1.4. FONCTIONS DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES..	19
1.4.1. L'adhésivité.....	21
1.4.2. La mobilité.....	23
1.4.3. Phagocytose - Bactéricidie.....	51
2. LES MECANISMES DE L'INFLAMMATION.....	59
2.1. GENERALITES.....	59
2.1.1. Définition.....	59
2.1.2. Histologie de l'inflammation.....	59
2.1.3. Etiologie de l'inflammation.....	61
2.2. MECANISMES DE L'INFLAMMATION.....	62
2.2.1. Les lysosomes.....	62
2.2.2. Les médiateurs vaso-actifs.....	69
2.2.3. Le système du complément sérique....	73
2.2.4. Facteur Hageman XII.....	75
2.2.5. Les prostaglandines.....	78
2.3. MODE D'ACTION DES ANTI-INFLAMMATOIRES.....	80
2.3.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.	80
2.3.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	80
DEUXIEME PARTIE :	
TRAVAUX PERSONNELS.....	82
1. MATERIELS ET METHODES.....	83
1.1. MATERIELS.....	83
1.1.1. Les sujets étudiés.....	83
1.1.2. Les médicaments testés.....	83

	<u>Pages</u>
1.2. METHODES.....	87
1.2.1. Migration en tube capillaire.....	87
1.2.2. Chimiotactisme.....	93
1.2.3. Etude statistique.....	104
 2. RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	 107
2.1. ETUDE DE LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE EN FONCTION DU TEMPS.....	 107
2.2. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE EN FONCTION DU TEMPS.....	 110
2.3. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LA MIGRATION SPONTANEE EN TUBE CAPILLAIRE..	 114
2.4. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN FONCTION DU TEMPS.....	 117
2.5. ETUDE DU CHIMIOTACTISME EN PRESENCE DE SUBSTANCES CYTOTAXIGENES.....	 119
2.6. ETUDE DE L'ACTION DU KETOPROFENE SUR LA CHIMIOTACTISME.....	 121
2.7. ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE ACETYL- SALICYLIQUE SUR LE CHIMIOTACTISME.....	 124
2.8. ETUDE DE L'ACTION DU TIEMONIUM SUR LE CHIMIOTACTISME.....	 127
2.9. ETUDE DE L'ACTION DU LEVAMISOLE SUR LE CHIMIOTACTISME.....	 130

